

Aus der
Klinik für Augenheilkunde
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Salvatore Grisanti

Untersuchungen von Homing-Rezeptoren in einem Xenograft-Mausmodell für das primäre vitreoretinale Lymphom

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- aus der Sektion Medizin -

**vorgelegt von
Neele Babst
aus Henstedt-Ulzburg**

Lübeck 2022

1. Berichterstatter*in: PD Dr. med. Vinodh Kakkassery

2. Berichterstatter*in: Prof. Dr. rer. nat. Timo Gemoll

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2023

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 06.06.2023

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Für Dich

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Auge	1
1.1.1	Anatomie und Physiologie	1
1.1.2	Maligne Lymphome und deren Einteilung.....	3
1.1.3	Stadieneinteilung von Lymphomen.....	4
1.1.4	Lymphome des Auges	5
1.2	Das primäre vitreoretinale Lymphom.....	6
1.2.1	Definition.....	6
1.2.2	Epidemiologie und prognostische Faktoren	7
1.2.3	Symptome	7
1.2.4	Diagnostik.....	8
1.2.5	Immunphenotypische und molekulargenetische Eigenschaften	9
1.2.6	Therapie	10
1.3	Pathogenese des primären vitreoretinalen Lymphoms	11
1.3.1	Hypothesen der Lymphomentstehung beim PVRL / PZNSL	11
1.3.2	Homing von Lymphozyten und B-Lymphomzellen.....	12
1.3.3	Tiermodelle für das PVRL.....	14
1.3.4	Chemokin-Rezeptoren CXCR4, CXCR5, CXCR7, CD44	16
1.3.4.1	Rezeptoren CXCR4 und CXCR7	17
1.3.4.2	Rezeptor CXCR5	18
1.3.4.3	Rezeptor CD44	18
1.4	Zielsetzung der Arbeit	19
2	Methoden.....	20
2.1	Beschreibung des Mausmodells	20
2.2	Materialien.....	22

2.2.1	Positivkontrollen.....	22
2.2.2	Antikörper	22
2.2.3	Chemikalien.....	23
2.2.4	Angesetzte Lösungen.....	24
2.2.5	Verbrauchsmaterial.....	25
2.2.6	Laborwaren.....	26
2.2.7	Laborgeräte	26
2.2.8	Elektronische Datenverarbeitung.....	27
2.3	Allgemeine Methoden.....	28
2.4	Vorbereitung der Proben.....	30
2.4.1	Anfertigung der Schnitte	30
2.4.2	Entparaffinierung	30
2.5	Immunfluoreszenzfärbungen.....	30
2.5.1	CD20 und CXCR4	30
2.5.2	CD20 und CXCR5	31
2.5.3	CD20 und CXCR7	32
2.5.4	CD20 und CD44	32
2.6	Mikroskopieren und Bildaufnahmen	32
2.6.1	Mikroskopische Bildauswertung.....	32
2.6.2	Manuelle Zellzählung.....	34
2.6.3	Bildbearbeitung.....	34
2.7	Auswertung mit dem immunreaktiven Score	34
2.8	Statistik.....	36
3	Ergebnisse.....	38
3.1	Expression von CD20 in SZNSL- und PZNSL-Augen	38
3.1.1	Lokalisation der CD20-positiven Zellen	38

3.1.2	Vorkommen von CD20/Homingrezeptor-positiven Zellen	40
3.1.2.1	Doppelfärbung CD20 und CXCR4	41
3.1.2.2	Doppelfärbung CD20 und CXCR5	42
3.1.2.3	Doppelfärbung CD20 und CXCR7	43
3.1.2.4	Doppelfärbung CD20 und CD44	44
3.1.3	Anteil der ko-exprimierenden Zellen an allen CD20-positiven Zellen in der Choroidea	44
3.1.4	Anteil der ko-exprimierenden Zellen an allen CD20-positiven Zellen in der Retina.....	45
3.1.5	Anteil der ko-exprimierenden Zellen an allen CD20-positiven Zellen im Ziliarkörper	46
3.2	Auswertung IRS PZNSL und SZNSL	47
3.2.1	Untersuchung der Gleichartigkeit der Infiltration mit CD20-positiven Zellen der Choroidea der Augenpaare mit dem IRS	47
3.2.2	Choroidea	49
3.2.2.1	Deskriptive Statistik	49
3.2.2.2	Schließende Statistik.....	50
3.2.3	Retina	51
3.2.3.1	Deskriptive Statistik	51
3.2.3.2	Schließende Statistik.....	52
3.2.4	Ziliarkörper.....	53
3.2.4.1	Deskriptive Statistik	53
3.2.4.2	Schließende Statistik.....	54
3.2.5	Sehnerv	55
3.2.5.1	Deskriptive Statistik	55
3.2.5.2	Schließende Statistik.....	56
4	Diskussion	58

4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	58
4.2	Vergleich mit anderen Mausmodellen für das PVRL.....	58
4.2.1	Infiltration mit CD20-positiven Lymphomzellen.....	58
4.3	Ko-Expression von CD20 und Homing-Rezeptoren.....	60
4.3.1	Ko-Expression von CD20 und CXCR4	61
4.3.2	Ko-Expression von CD20 und CXCR5	63
4.3.3	Ko-Expression von CD20 und CXCR7	64
4.3.4	Ko-Expression von CD20 und CD44	66
4.4	Limitationen.....	68
5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	70
6	Zusammenfassung	72
7	Literatur	74
I.	Anhang	87
A.	Abbildungen des Anhangs.....	87
B.	Abkürzungsverzeichnis.....	89
C.	Abbildungsverzeichnis.....	93
D.	Tabellenverzeichnis.....	94
II.	Ethikvotum.....	95
III.	Tierantrag	96
IV.	Danksagung	98

1 Einleitung

1.1 Das Auge

1.1.1 Anatomie und Physiologie

Der Augapfel (Bulbus oculi) sitzt zusammen mit den sechs Augenmuskeln und seinen Leitungsbahnen in der knöchernen Orbita des Schädels. Die Leitungsbahnen zur Versorgung des Auges (Tabelle 1) treten durch die Fissura orbitalis superior und inferior und den Canalis opticus in die Orbita ein(1,2).

Tabelle 1: Die knöcherne Orbita

Öffnung	Inhalt
Canalis opticus	N. opticus, A. ophthalmica
Fissura orbitalis superior	N. oculomotorius, N. trochlearis, N. abducens, N. ophthalmicus, V. ophthalmica superior
Fissura orbitalis inferior	N. zygomaticus, N. infraorbitalis, A. infraorbitalis, V. ophthalmica inferior

Die Tabelle zeigt die drei wichtigsten Öffnungen der knöchernen Orbita und die jeweils hindurchziehenden Leitungsbahnen(1,2).

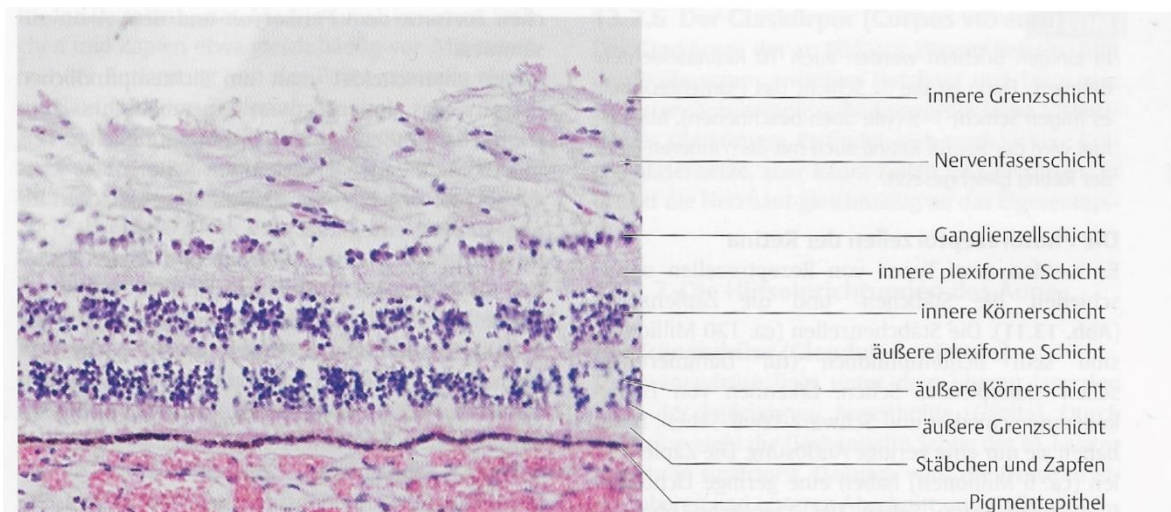
Das Auge wird durch vier gerade (M. rectus superior und inferior, M. rectus medialis und lateralis) und zwei schräge Augenmuskeln (M. obliquus superior und inferior) bewegt. Fast alle Augenmuskeln werden durch den N. oculomotorius innerviert. Ausgenommen sind der M. rectus lateralis, welcher vom N. abducens innerviert wird, und der M. obliquus superior, welcher vom N. trochlearis innerviert wird(1,2).

Das Auge selbst lässt sich durch die Linse (Lens) in den vorderen und den hinteren Augenabschnitt gliedern. Zum vorderen Augenabschnitt gehört die Hornhaut (Kornea), die Bindehaut (Sklera), die vordere und die hintere Augenkammer, der Ziliarkörper (Corpus ciliaris), die Regenbogenhaut (Iris) und die Linse. Zum hinteren Augenabschnitt gehören der Glaskörper (Corpus vitreum), die Aderhaut (Choroidea) und die Netzhaut (Retina)(1,2).

Der Glaskörper ist die größte Struktur des Bulbus oculi und dient zu dessen Formerhaltung. Weil er nahezu vollständig aus Wasser (99%), Hyaluronsäure und kollagenen Fasern besteht, ist der Glaskörper durchsichtig(1,2).

Die Retina besteht aus zehn Schichten, welche sich gut unter dem Mikroskop betrachten lassen (Abb. 1). Von außen nach innen sind dies das retinale Pigmentepithel, die Photorezeptorzellen, die äußere Grenzschrift, die äußere nukleäre Schicht, die äußere plexiforme Schicht, die innere nukleäre Schicht, die innere plexiforme Schicht, die Ganglienzellschicht, die Nervenfaserschicht und die innere Grenzschrift. Die Axone der Ganglienzellen vereinigen sich zum N. opticus. Dort, wo dieser aus der Netzhaut austritt, befindet sich der blinde Fleck. Für den Seheindruck muss das durch die Kornea und die Pupille in das Auge einfallende Licht folglich alle Schichten der Retina durchqueren, bevor es auf die Photorezeptorzellen trifft. Im Bereich der Fovea centralis befinden sich keine Blutgefäße in der Retina, sodass dort der Punkt des schärfsten Sehens lokalisiert ist. Hier kann das Licht fast ungehindert auf die Photorezeptorzellen treffen, welche das elektromagnetischen Signal des Lichts in biochemische Signale umwandeln. Diese Informationen gelangen über den zweiten Hirnnerv, den N. opticus, zum visuellen Cortex des Gehirns(1,2).

Abb. 1: Die zehn Schichten der Retina



Zu sehen ist die Histologie der Retina (Azan-Färbung, Vergrößerung 200-fach). Die 10 Schichten der Retina sind an der rechten Seite beschriftet. An die Choroidea grenzt das Pigmentepithel, gefolgt von der Schicht der Stäbchen und Zapfen, der äußeren Grenzschrift, der äußeren Körnerschicht, der äußeren plexiformen Schicht, der inneren Körnerschicht, der inneren plexiformen Schicht, der Ganglienzellschicht, der Nervenfaserschicht und der inneren Grenzschrift. Letztere grenzt an den Glaskörper(3).

Die Choroidea besteht aus drei verschiedenen Schichten, in denen sich Nerven und Gefäße befinden. Diese gefäßreiche Struktur dient der Versorgung des retinalen Pigmentepithels und der Photorezeptorzellen. Zudem gehört zur Choroidea die Bruch-Membran, welche keine Leitungsbahnen enthält. Sie ist Teil der Blut-Retina-Schranke, welche aus einer inneren und einer äußeren Schicht besteht. Die innere Schicht bildet sich aus Endothelzellen, welche mit Tight Junctions verbunden sind. Diese wird auch Lamina choroidocapillaris der Aderhaut genannt. Die äußere Schicht besteht aus verbundenen Epithelzellen des retinalen Pigmentepithels(1–3).

Das Auge ist folglich ein abgeschlossenes Kompartiment. Dadurch ist das Auge, genau wie das Gehirn, die Hoden und die Plazenta, ein immunprivilegiertes Organ(4–6). Die ursprüngliche Definition des Immunprivilegs gründete sich auf der Beobachtung, dass in diesen Organen im Gegensatz zu nicht-immunprivilegierten Organen körperfremde Transplantate nicht abgestoßen werden(7). Daraus folgt, dass in immunprivilegierten Organen zum einen bestimmte vulnerable Zelltypen wie z.B. Neurone nicht durch eine Immunreaktion erkannt und zerstört werden. Zum anderen können immunprivilegierte Organe aber auch Tumorzellen die Möglichkeit der Immunevasion bieten(8).

1.1.2 Maligne Lymphome und deren Einteilung

Maligne Lymphome sind hämatologische Neoplasien und lassen sich in Hodgkin-(etwa 10%) und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL, etwa 90%) einteilen(9). Beim Hodgkin-Lymphom (Erstbeschreibung 1832 von Thomas Hodgkin) lassen sich mikroskopisch Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen nachweisen(10,11). Diese Zellen finden sich beim NHL nicht. NHL sind eine sehr heterogene Gruppe mit unterschiedlichen Eigenschaften(12). Sie machen ungefähr 4% aller Krebsneuerkrankungen in Deutschland aus (ca. 18.500 Neuerkrankungen im Jahr 2018)(13). Die NHL sind zu ca. 90% B-Zell- und zu ca. 10% T-Zell-Lymphome. B-Zell-NHL-Lymphome tragen, wie viele andere B-Zell-Neoplasien auch, unter anderem den B-Zell-Marker CD20 als charakteristisches Merkmal(14). Weiterhin unterteilt werden diese Untergruppen in indolente und aggressive Formen. Das häufigste NHL ist das diffus großzellige B-Zell-Lymphom, welches zu den aggressiven NHL gezählt wird und 25-30% aller NHL ausmacht. Das zweithäufigste

NHL ist das folliculäre Lymphom, welches zu den indolenten NHL gehört. Es macht etwa 15-20% aller NHL aus(11,15).

Eine genauere Einteilung erfolgt über die WHO Classification of Lymphoma (Revision 2016). Darin werden Lymphome in fünf große Gruppen eingeteilt: B-Zell-Neoplasien, T-Zell und NK-Zell-Neoplasie, Hodgkin-Lymphome, lymphoproliferative Störungen nach Transplantation (PTLD) und histiozytischen sowie dendritischen Neoplasien. Je nach klinischer Präsentation werden diese Gruppen weiter unterteilt. Zu diesen Untergruppen gehören unter anderem die disseminierten, die primär nodalen und die primär extranodalen Lymphome. Primär bedeutet dabei, dass das Lymphom als Erstes am jeweiligen Ort entstanden ist. Sekundäre Lymphome sind meist systemische, disseminierte Lymphome, die sich im gesamten Körper ausbreiten. Anhand ihrer morphologischen und immunphenotypischen Charakteristika werden die Lymphome in diese Gruppen eingeteilt(16).

1.1.3 Stadieneinteilung von Lymphomen

Die Stadieneinteilung der malignen Lymphome erfolgt mit Hilfe der Ann-Arbor-Klassifikation, welche 1971 in der gleichnamigen Stadt Ann Arbor, Michigan, USA entwickelt wurde(17). Ursprünglich wurde die Klassifikation nur für Hodgkin-Lymphome entwickelt, sie ist aber auch für das Staging von NHL geeignet(18), so auch für Lymphome des Auges(19). Die Klassifikation richtet sich dabei vorrangig nach befallenen Lymphknotenstationen und extranodalem Befall, enthält jedoch keine Information zum Grading der Tumoren. Das Staging von NHL ist besonders für die spätere Therapieentscheidung von Bedeutung(19). In der nachfolgenden Tabelle 2 sind die einzelnen Stadien aufgelistet und erklärt.

Tabelle 2: Darstellung der Ann-Arbor-Klassifikation

Stadien	
Stadium I	Befall einer Lymphknotenregion oder eines extranodalen Herdes
Stadium II	Befall ≥ 2 Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells oder lokalisierter Befall eines extralymphatischen Organs mit Befall ≥ 1 Lymphknotenregionen auf derselben Seite des Zwerchfells
Stadium III	Befall von Lymphknotenstationen auf beiden Seiten des Zwerchfells ggf. mit Befall eines extralymphatischen Organs oder der Milz oder beidem
Stadium IV	Disseminierter Befall von ≥ 1 extralymphatischen Organen mit oder ohne Lymphknotenbefall
Zusätze	
A	Ohne B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust)
B	Mit B-Symptomatik
E	Mit extranodalem Befall
S	Mit Befall der Milz
X	„Bulky disease“: der Tumor misst mehr als 10cm oder das Mediastinum entspricht $> 1/3$ des Thoraxdurchmessers

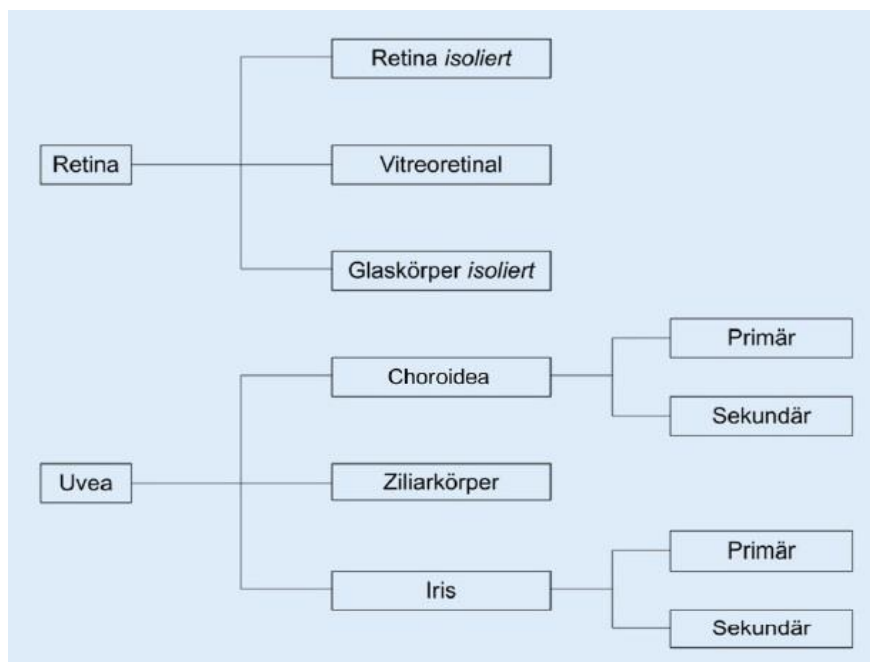
Zu sehen sind in dieser Tabelle die Stadien der Ann-Arbor-Klassifikation sowie deren Zusatzbezeichnungen mit der jeweiligen Erklärung(17).

1.1.4 Lymphome des Auges

Tumorerkrankungen des Auges sind insgesamt selten(20). Auch extranodale Lymphome können das Auge befallen. Von allen Lymphomerkrankungen sind rund 30% extranodale Lymphome, von denen wiederum ca. 10% im Auge auftreten können. Dabei treten Lymphome in etwa 90% periokulär und in unter 10% intraokulär auf.(21,22) Am häufigsten handelt es sich um B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome, T-Zell-Lymphome sind hingegen sehr selten(23).

Intraokuläre Lymphome (Abb. 2) lassen sich anhand ihrer anatomischen Lokalisation in retinale und uveale Lymphome einteilen. Zu den uvealen Lymphomen gehören choroidale Lymphome, iridiale Lymphome und Lymphome des Ziliarkörpers. Zu den retinalen Lymphomen gehören die isoliert die Retina oder den Glaskörper betreffenden Lymphome. Weiterhin dazu zählt das beide Strukturen befallende primäre vitreoretinale Lymphom (PVRL), welches zu den häufigsten primär intraokulären Lymphomen zählt(21,22,24,25).

Abb. 2: Die Einteilung intraokulärer Lymphome



Die Abbildung zeigt eine schematische Einteilung intraokulärer Lymphome. Retinale Lymphome betreffen entweder isoliert die Retina bzw. den Glaskörper oder treten als primäres vitreoretinales Lymphom auf. Uveale Lymphome infiltrieren entweder den Ziliarkörper, die Choroidea oder die Iris. Die beiden Letzteren lassen sich weiter in primäre und sekundäre Lymphome einteilen(22,24).

1.2 Das primäre vitreoretinale Lymphom

1.2.1 Definition

Das PVRL ist ein aggressives, seltenes Non-Hodgkin-Lymphom, dennoch gehört es zu den häufigsten primären okulären Lymphomen. Zu 98% wird ein Lymphom vom Typ des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) nachgewiesen, Lymphome vom T-Zell-Typ sind sehr selten(26). Das PVRL ist mit dem primären zentralen Nervensystem Lymphom (PZNSL) eng verwandt bzw. gilt als Erscheinungsform des PZNSL im Auge. Dieses macht 4-6% aller Hirntumore

aus(27,28). 20% der Patienten, die an einem PZNSL erkrankt sind, entwickeln auch ein PVRL. Umgekehrt entwickeln 80% der Patienten, die an einem PVRL erkrankt sind, auch im Krankheitsverlauf ein PZNSL(29–31).

1.2.2 Epidemiologie und prognostische Faktoren

Das primäre vitreoretinale Lymphom ist eine seltene maligne primäre Lymphomerkkrankung des Auges. Die Inzidenz wird mit ca. 0,05-0,5 / 100.000 Einwohner pro Jahr angegeben, kann aber auf Grund der Seltenheit der Erkrankung nur geschätzt werden(22,32,33). Dennoch gehört das PVRL zu den häufigsten primären intraokulären Lymphomen(27). Auf Grund der ZNS-Beteiligung hat das PVRL eine sehr schlechte Prognose(34). Die 1-Jahres-Überlebensrate beim ZNS-Befall durch ein PVRL beträgt 25-40%. Die mittlere Überlebensrate für das isolierte PVRL beträgt 57 Monate. Das PVRL ist eine Erkrankung des älteren Menschen mit einem Durchschnittsalter von 60 Jahren(26,34). Beide Geschlechter sind etwa gleich häufig betroffen(34).

Es sind kaum Risikofaktoren für das PVRL bekannt. Das PVRL kann aber im Rahmen einer Immunsuppression durch eine HIV- oder EBV-Infektion auftreten und wird dann als getrennte Erkrankung betrachtet(35,36). Dennoch steigt die Inzidenz des PVRL auch bei immunkompetenten Personen über die letzten Jahre an(37).

1.2.3 Symptome

Das PVRL zeigt in 60-90% der Fälle eine bilaterale Symptomatik, doch gerade zu Symptombeginn können die Beschwerden auch einseitig vorliegen(31,34). Die Diagnose des PVRL ist häufig durch unspezifische Befunde bzw. durch das Masquerade-Syndrom im Sinne des Vortäuschens einer unklaren intraokulären Entzündung, wie z.B. einer Uveitis, erschwert(35). Im Mittel dauert es von Symptombeginn bis hin zur Diagnose 6 bis 12 Monate(26).

Zu den eher unspezifischen Symptomen zählen Verschwommensehen, Visusverlust und Glaskörpertrübungen(22,32). Systemische Symptome und eine B-Symptomatik treten selten auf. Bei einer ZNS-Beteiligung kommt es zur Ausbildung neurologischer Symptome. Häufig entwickeln Patienten eine Persönlichkeitsveränderung, welche durch die Lokalisation des PZNSL im

Frontallappen erklärt wird(26). Aber auch eine diffuse Beteiligung des ZNS ist typisch für PZNSL(37).

1.2.4 Diagnostik

Die Diagnose des PVRL ist oftmals langwierig und schwierig, da es wie „ein Chamäleon“ verschiedene andere Erkrankungen imitieren kann und daher auch als Maskerade-Syndrom bezeichnet wird(26,37).

Funduskopisch können lymphomatöse Ablagerungen um retinale Blutgefäße eine Vaskulitis vortäuschen. Auch können weitere cremefarbene Ablagerungen retinal, subretinal oder im retinalen Pigmentepithel (RPE) stark an Drusen erinnern (Abb. 3). Die Lymphomzellen können sich zudem im subretinalen Raum ansammeln, wobei sie selten die Bruchmembran passieren. In der Fluorescein-Angiographie (FAG) können die genannten Veränderungen als sog. „Leopardenmuster“ imponieren. RPE-Veränderungen lassen sich auch in der okulären Kohärenztomographie (OCT) nachweisen(26).

Abb. 3: Fundusaufnahme einer Patientin mit PVRL



Auf dieser Fundusaufnahme einer Patientin mit primärem vitreoretinalen Lymphom sind inselartige Aufhellung über den gesamten Fundus zu sehen, die eine Lymphomzellinfiltration der Retina darstellt.

Die malignen Zellen können weiterhin in den Glaskörper gelangen, wo sie wie ein Schleier die Funduskopie erschweren können. Die Glaskörperbeteiligung, die bei 50-100% der Patienten auftritt, gilt beim PVRL als die häufigste klinische Manifestation(26,34,38). Auch in der Vorderkammer können solche Zell-Aggregate nachgewiesen werden, weshalb fälschlicherweise an eine Uveitis gedacht werden kann. Sollten sich die Zellen im trabekulären Maschenwerk ansammeln, können sie zu einem sekundären Glaukom führen(37).

Der Goldstandard zur Diagnose eines PVRL ist der Nachweis von Lymphomzellen intraokular. Dazu bietet sich die diagnostische Vitrektomie an, da diese deutlich geringere operative Risiken aufweisen als eine retinale Biopsie(29,39). Vor einer Vitrektomie ist wichtig, dass eine Therapie mit Kortikosteroiden reduziert bzw. ausgeschlichen wird, da diese die Zahl der Lymphomzellen reduzieren kann(26).

Zur Beurteilung einer möglichen ZNS-Beteiligung sollte zusätzlich ein kraniales MRT angefertigt werden. Bei einer ZNS-Beteiligung lassen sich in der T2-Wichtung iso- bis hypointense Läsionen nachweisen, die meist von einem Ödem umgeben sind und stark Kontrastmittel anreichern(35).

1.2.5 Immunphenotypische und molekulargenetische Eigenschaften

Mit Hilfe von zytologischen und histopathologischen Verfahren können Lymphomzellen auf Grund ihres typischen Expressionsmusters identifiziert werden. Histologisch zeigen sich große Zellen, mit großen unregelmäßig geformten Zellkernen und auffälligen Nukleoli. Zusätzlich finden sich viele nekrotische Zellen, da Lymphomzellen äußerst instabil sind(40,41). Zu den molekularbiologischen Markern gehören die B-Zell-Marker CD20 und CD79a sowie Bcl-2, Bcl-6, MUM1/IRF4 und CD10(42). CD20 ist ein typisches Oberflächenprotein auf B-Lymphozyten (außer auf enddifferenzierten Plasmazellen), wird aber auch auf malignen B-Zellen exprimiert. Dabei schwankt die Expressionsstärke zwischen den einzelnen Lymphomentitäten stark. DLBCL zeigen die höchste Oberflächenexpression von CD20. Die Funktion von CD20 bleibt bis heute ungeklärt(14). CD79a ist ebenfalls ein Oberflächenprotein, welches von B-Zellen gebildet wird und vom DLBCL exprimiert wird. CD79a bindet an CD79b und bildet

so den B-Zell-Rezeptor (BCR), welcher an der humoralen Immunantwort beteiligt ist(43). CD79a und CD20 sind somit beide B-Zell-Marker, die häufig zusammen für eine Immunmarkierung von (malignen) B-Zellen verwendet werden(44). Bcl-2 ist ein regulatorisches Protein bei der Apoptose von Zellen, Bcl-6 wirkt regulierend bei der Keimzentrumsreaktion. Beide Proteine sind durch Chromosomentranslokation beim DLBCL verändert und führen so zur unkontrollierten Zellproliferation(45). Des Weiteren zeigen die Lymphomzellen einen hohen Anteil des Proliferationsmarkers Ki-67, welcher ebenfalls die Aggressivität des PVRL widerspiegelt(46).

Zur Unterscheidung zwischen einem malignen Geschehen und einer reaktiven Lymphozytose eignen sich zum einen Polymerase-Kettenreaktion-Untersuchungen (PCR) der Zell-DNA und zum anderen die Bestimmung von Zytokinen im Kammerwasser und Glaskörper. Bei einem malignen Prozess wie dem PVRL zeigt die PCR-Untersuchung eine Monoklonalität der B-Zellen und zusätzlich Gen-Rearrangements der Leichtketten Immunglobuline, wie es für B-Zell-Lymphome typisch ist. Ebenfalls erlaubt eine Erhebung des IL-10/IL-6-Quotienten eine Unterscheidung zwischen malignem und entzündlichem Geschehen. Da B-Lymphomzellen vermehrt IL-10 produzieren und inflammatorische Zellen vermehrt IL-6 sezernieren, spricht ein Quotient von über 1 für das Vorliegen eines PVRL. Ein Quotient von unter 1 spricht dagegen eher das Vorliegen einer Uveitis(26,41). Auf Grund geringer Zellausbeute bei Glaskörperbiopsien und der daraus resultierenden hohen Falsch-Negativ-Rate werden zur Zeit weitere zellunabhängige diagnostische Marker erforscht(34). Die Analyse von vitrealer micro Ribonukleinsäure (miRNA) sowie der MYD88 Mutation in den Lymphomzellen stellen neue Optionen zur Erhöhung der Diagnosesicherheit dar, die aktuell weiter erforscht werden müssen(47,48).

1.2.6 Therapie

Bis heute gibt es auf Grund der Seltenheit der Erkrankung wenig Evidenz und daher keinen international einheitlichen Konsens zur Therapie des PVRL(35). Die derzeitigen Therapieempfehlungen für das PVRL wurden 2011 von der „International PCNSL Collaborative Group“ erarbeitet(49). Die Therapie des PVRL richtet sich nach dem Krankheitsstadium. Entscheidend ist der Befall (unilateral,

bilateral) sowie das Auftreten einer ZNS-Beteiligung. Ziele der Behandlung sind die vollständige Remission und die Erhaltung des Sehsinns(35).

Bei einem unilateral auftretendem PVRL ohne ZNS-Dissemination wird lokal mit intravitrealen Injektionen von Methotrexat (MTX) und / oder dem Anti-CD20-Antikörper Rituximab behandelt. Alternativ kann eine systemische medikamentöse Therapie und eine lokalisierte perkutane Strahlentherapie mit Dosen von 30-50 Gy erfolgen. Auf Grund der höheren okulären Nebenwirkungsraten der Bestrahlung bzw. der systemischen Nebenwirkungen bei der medikamentösen Therapie wird jedoch bei gleicher Wirksamkeit die intravitrealen Therapie eher empfohlen(26). Höhere Strahlendosen finden bei PVRL-Rezidiven Anwendung(33). Bei einem bilateralen PVRL oder bei einer zusätzlichen ZNS-Beteiligung wird die lokale Injektion von MTX / Rituximab mit einer systemischen Therapie, die in der Regel Hochdosis-MTX beinhaltet, kombiniert. Zusätzlich kann am Auge gerade im Rezidivfall eine bilaterale perkutane Bestrahlung erfolgen(25,26,33).

1.3 Pathogenese des primären vitreoretinalen Lymphoms

Die Pathogenese des PVRL ist bis heute weitestgehend unverstanden. Es werden verschiedene Hypothesen zur Lymphomentstehung diskutiert. Diese werden nachfolgend erklärt.

1.3.1 Hypothesen der Lymphomentstehung beim PVRL / PZNSL

Da das Gehirn und auch das Auge zu den immunprivilierten Organen gehören, ist es eher unwahrscheinlich, dass die sog. primären Lymphome PVRL bzw. PZNSL tatsächlich primär dort entstehen, obwohl ihr Name dies suggeriert(4,5,50). Es werden verschiedene Hypothesen zur Pathogenese des PVRL diskutiert(5): Es besteht die Möglichkeit, dass Patienten ein sporadisches systemisches Lymphom bekommen, dass sich überall im Körper, auch im Gehirn, ausbreitet. Der Körper reagiert mit einer generalisierten Immunantwort und das Lymphom wird zurückgedrängt. Da das Gehirn aber zu den immunprivilierten Organen gehört, dort demnach kaum Immunzellen vorkommen, kann sich das Lymphom hier ausbreiten. Gegen diese Theorie spricht aber, dass andere immunprivilierte Organe, wie z.B. der Hoden, nicht von diesem systemischen Lymphomtyp befallen werden(51).

Die zweite Hypothese besagt, dass eine normale Entzündung, eine Infektion oder ein Trauma des ZNS Lymphozyten anlockt. Dort können sie entarten und ein Lymphom kann entstehen. Allerdings zeigt sich bei Patienten mit ZNS-Entzündungen nicht unbedingt eine erhöhte Inzidenz für ZNS-Lymphome(52).

Die dritte Theorie geht davon aus, dass das Lymphom außerhalb des ZNS entsteht und dann mit Hilfe spezieller Zielmoleküle in das ZNS disseminiert. Dieser Vorgang wird Homing genannt. Diese Theorie wird durch Pasqualucci et al. (2018) ebenfalls aufgenommen. Laut diesem Review entstehen DLBCL in Lymphfollikeln sekundär lymphatischer Organe. Erklärt wurde die These dadurch, dass sich die genetischen Eigenschaften der B-Lymphome, die der Keimzentrumsreaktion unterlagen, sehr ähneln und deshalb nur in einem Keimzentrum entstanden sein können(53).

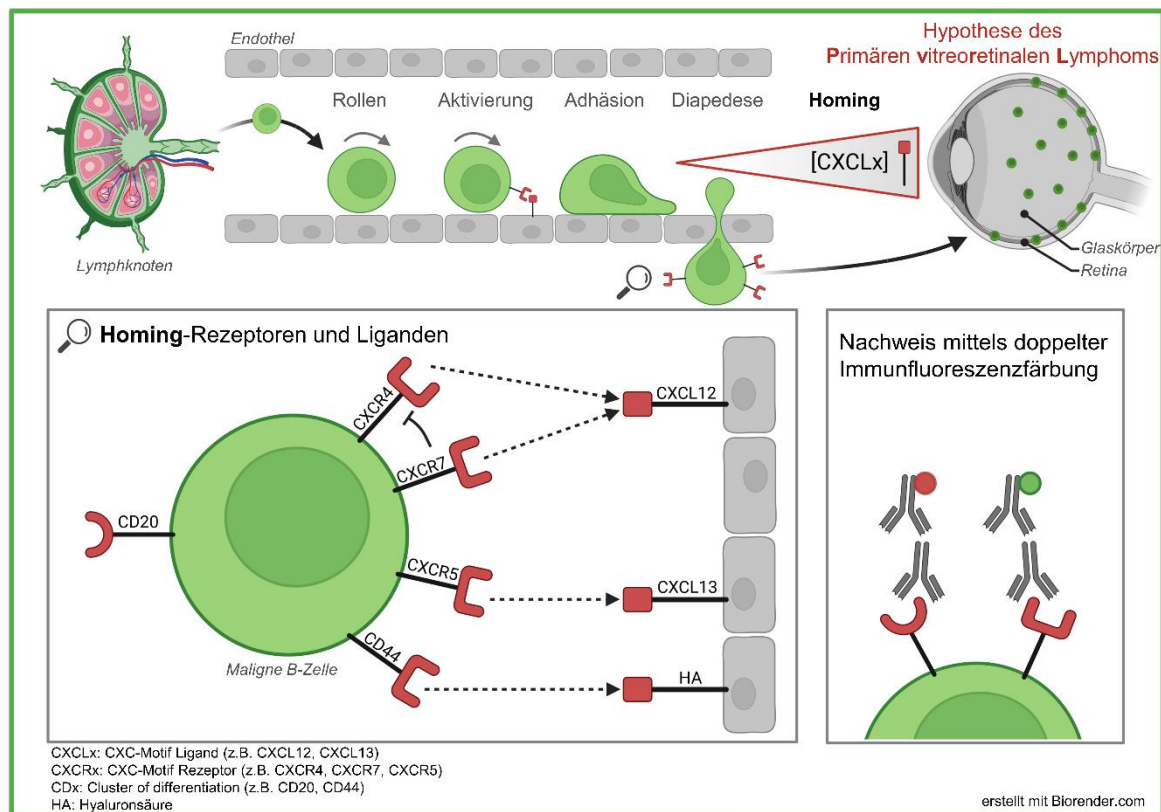
1.3.2 Homing von Lymphozyten und B-Lymphomzellen

Homing beschreibt das Wandern bzw. das Zurückkehren von immunkompetenten Lymphozyten in den Lymphfollikel bzw. in andere sekundäre lymphatische Organe, nachdem sie durch Gewebe gewandert sind. Im Follikel vermehren sich dann die spezifisch gegen ein Antigen gerichteten Immunzellen(54,55). Der Begriff Homing wird auch in der Onkologie – v.a. in der Erklärung der Pathogenese von primären ZNS-Lymphomen verwendet. Hier meint Homing das Wandern eines malignen (meist B-Zell-) Klons in das ZNS, oder im Falle des von uns untersuchten PVRLs in das Auge(56–58).

Das Homing (Abb. 4) wird von vielen verschiedenen Rezeptor-Liganden-Interaktionen vermittelt. Grob einteilen lässt sich der Prozess in die vier Schritte: Rollen, Aktivierung, Adhäsion und Diapedese von Lymphozyten. Lymphozyten wandern mit dem Blutstrom durch den Körper. Dabei kommt es zuerst durch Selektine und deren Liganden zu lockeren Bindungen zwischen Lymphozyten und Gefäßendothel. Durch die Scherkräfte des Blutes werden diese Bindungen immer wieder gelöst und erneut geknüpft. Dies wird auch als „Rollen“ der Lymphozyten am Gefäßendothel bezeichnet. Durch die Bindung von Chemokinen an ihren Rezeptor können Lymphozyten während des Rollens aktiviert werden. Durch das Chemokinsignal verändern Integrine, die auf der Oberfläche der Lymphozyten sitzen, ihre Konformation und erhöhen die Affinität zu ihren Liganden, die auf der

Endotheloberfläche sitzen. Nun ist eine feste Bindung zwischen Lymphozyten und Endothel entstanden. Als Nächstes folgt die Diapedese der Lymphozyten durch das Gefäßendothel in das Gewebe. Die weitere Wanderung der Lymphozyten im Gewebe erfolgt dann entweder zufällig oder aber anhand von Konzentrationsgradienten chemotaktischer Substanzen, wie z.B. den Chemokinen. Deren Konzentration ist am Ort ihrer Produktion, z.B. durch eine Entzündung oder einen malignen Prozess, am höchsten(59,60).

Abb. 4: Die Hypothese des Homings von malignen B-Lymphomzellen



Dargestellt ist eine schematische Abbildung, welche den Weg der B-Lymphomzelle anhand von Chemokingradienten in das Auge illustriert. Am wahrscheinlichsten ist es, dass Lymphomzellen im Lymphknoten entstehen. Die Zellen verlassen diesen und gelangen in die Blutbahn, welche sie genau wie Lymphozyten verlassen. Dieser Prozess besteht aus den Schritten Rollen, Aktivierung, Adhäsion und Diapedese durch das Endothel. Die Aktivierung erfolgt durch Bindung von Chemokinen an Chemokinrezeptoren. Im Gewebe erfolgt die Wanderung dann anhand von Chemokingradienten zum Ort der höchsten ChemokinKonzentration. Dies kann z.B. das Auge sein. Dort infiltrieren die Lymphomzellen vorrangig den Glaskörper und die Retina, wodurch das PVRL entsteht. Für diesen Prozess, der Homing genannt wird, sind besonders vier Homing-Rezeptoren interessant: CXCR4, CXCR5, CXCR7 und CD44. CXCL12 kann sowohl an CXCR4 und CXCR7 binden, wobei letzterer ein negativer Regulator von CXCR4 ist. CXCL13 ist der Ligand von CXCR5. Der Ligand von CD44 ist die Hyaluronsäure (HA). Wir vermuten, dass CD20-positive Lymphomzellen die genannten Rezeptoren ko-exprimieren. Dies wollen wir mit doppelten indirekten Immunfluoreszenzfärbungen nachweisen. (Diese Abbildung wurde als Graphical Abstract von der Doktorandin selbst erstellt und im Rahmen des Graphical Abstract Contest des Universitären Cancer Centers Schleswig Holstein (UCCSH) mit dem 3. Platz prämiert(61).)

1.3.3 Tiermodelle für das PVRL

Die Pathogenese des primären vitreoretinalen Lymphoms ist bis heute weitestgehend ungeklärt. Studien am Menschen gestalten sich schwierig, da das PVRL eine sehr niedrige Inzidenz aufweist. Zusätzlich sind in Glaskörperproben meist sehr wenige bis keine Lymphomzellen vorhanden. Hinzu kommt, dass die malignen Zellen sehr instabil sind und sich schwer anzüchten lassen. All dies führte zu der Entwicklung von verschiedenen Tiermodellen (Tabelle 3) zur Erforschung der Pathogenese der PVRL. Die meisten Tiermodelle basieren auf T-Lymphomzellen, B-Zell-Modelle sind seltener. Touitou et al. und Aronow et al. haben verschiedene Tiermodelle für das PVRL zusammengefasst(62,63). Wichtig ist zu erwähnen, dass in einigen Quellen noch von primären intraokulären Lymphomen (PIOL) geschrieben wird. Nach heutiger Nomenklatur ist diese Bezeichnung nicht mehr aktuell, daher wird hier immer der Begriff PVRL genutzt. Die Modelle werden nachfolgend kurz erklärt.

Das erste Mausmodell für T-Zell-Lymphome entwickelten Assaf et al. (1997). Sie konnten zeigen, dass T-Lymphomzellen in neugeborenen Mäusen in die Augen und das Gehirn gelangen, und dort PVRL bzw. PZNSL induzierten(64). Hochman et al. (2001) konnten in ihrem Mausmodell zeigen, dass T-Lymphomzellen, welche intraperitoneal gespritzt wurden, in die Augen und das Gehirn der Mäuse homen. Dabei gelangten die malignen T-Zellen über die Hirnnerven bzw. den Plexus choroideus in das Gehirn, wo sie sich diffus ausbreiten. Von dort gelangen die Lymphomzellen retrograd über den N. opticus in das Auge. Über das Chiasma opticum kann auch das kontralaterale Auge erreicht werden(56). Chan et al. (2005) nutzten die gleichen T-Zell-Linien, welche in diesem Mausmodell intravitreal gespritzt wurden. Auch hier entwickelten die Tiere PVRL(65). Allerdings beziehen sich all diese ersten Mausmodelle auf T-Zell-Lymphome, welche nur etwa 10% der PVRL ausmachen. In all diesen Modellen wurden murine T-Lymphomzellen in BALB/c-Mäuse (Wortverknüpfung aus Bagg (Erstbeschreiber Healsy J. Bagg 1913) und Albino(66)) injiziert.

Li et al. (2006) entwickelten ein neues xenogenes Mausmodell, in dem humane B-Lymphomzellen SCID-Mäusen intravitreal gespritzt wurden. SCID steht für „severe combined immunodeficiency“. Die Mäuse entwickeln eine schwere

Immunschwäche bedingt durch eine eingeschränkte B- und T-Zellfunktion(67). Auch in diesem Modell entwickelten die Mäuse PVRL(68). Da in diesem SCID-Maus-Modell die Mikroumgebung des Tumors und die Rolle des adaptiven Immunsystems nicht gut beurteilt werden konnten, entwickelten Touitou et al. (2007) ein neues B-Lymphom-Mausmodell, das mit immunkompetenten adulten BALB/c Mäusen arbeitet. Die murinen B-Lymphomzellen wurden intravitreal gespritzt, woraufhin die Mäuse PVRL entwickelten(69). Mineo et al. (2008) entwickelten ein xenogenes B-Lymphom-Mausmodell zur Testung von einer intravitrealen Rituximab-Therapie. Dafür wurden humane DLBCL-Zellen sowohl intravitreal als auch direkt in das Gehirn von 6 Wochen alten C3H/HeN-Mäusen (Kreuzung aus weiblichen BALB/c- und männlichen DBA-Mäusen) injiziert. Auch in diesem Modell entwickelten die Mäuse nach wenigen Wochen PVRL bzw. PZNSL(70). Auch Ben Abdelwahed et al. (2013) entwickelten ein Mausmodell zur Überprüfung einer Therapie mit dem CD20-Antikörper Ublitiximab. In diesem Modell erfolgte bei weiblichen, 6-8 Wochen alten BALB/c-Mäusen sowohl eine intravitreale als auch eine intrazerebrale Injektion mit murinen B-Lymphomzellen. Die Mäuse entwickelten daraufhin ebenfalls PVRL bzw. PZNSL(71).

Tabelle 3: Mausmodelle für PVRL bzw. PZNSL

Autor	Maus	Zellen	Injektion
Assaf et al. (1997)	BALB/c	Murine T-Lymphomzellen (S49)	intraperitoneal
Hochman et al. (2001)		Murine T-Lymphomzellen (H2 ^d	
Chan et al. (2005)		Rev-2-T-6 aus S49)	intravitreal
Li et al. (2006)	SCID	Humane B-Lymphomzellen (CA46)	intravitreal / intracerebral
Touitou et al. (2007)	BALB/c	Murine B-Lymphomzellen (H2 ^d IIA1.6 aus A20-2J)	
Mineo et al. (2008)	C3H/HeN	humane B-Lymphomzellen (DLBCL, 38C13 CD20-positiv)	
Ben Abdelwahed et al. (2013)	BALB/c	Murine B-Lymphomzellen (A20.IIA-GFP)	

Diese Tabelle fasst die im Textabschnitt 1.3.3. erklärten Mausmodelle für das primäre vitreoretinale Lymphom bzw. primäre ZNS Lymphome zusammen. Modifiziert nach: Touitou et al. und Aronow et al. (62,63)

Wir nutzen ein neues Patient-derived-Xenograft (PDX) B-Zell-Lymphom-Mausmodell, in dem Tumorbiopsien humaner zerebraler B-Zell Lymphome in immunsupprimierte Mäuse orthotop (intracerebral) oder heterotop (subkutan, intrasplenisch, intraperitoneal, intravenös) injiziert werden und dann in einem Teil der Fälle Lymphommanifestationen innerhalb des ZNS ausbilden(72). Dies erlaubt als erstes Mausmodell genaue Untersuchungen des Homings von humanen CD20-positiven B-Lymphomzellen und wird im Methodenteil weiter beschrieben.

1.3.4 Chemokin-Rezeptoren CXCR4, CXCR5, CXCR7, CD44

Auf molekularer Ebene gibt es viele Rezeptoren und Liganden, die ein Homing der Zellen vermitteln könnten (Tabelle 4). Besonders interessant sind dabei die Chemokine und ihre Rezeptoren. Dabei sind die CXCR4-CXCR7-CXCL12 und die CXCR5-CXCL13-Achse besonders relevant für das B-Zell-Homing.

Tabelle 4: Ort der Expression von Chemokin-Rezeptoren und deren Liganden

Rezeptor	Exprimiert von:
CXCR4	Eher ubiquitäres Expressionsmuster: Stammzellen (z.B. hämatopoietische Stammzellen, epitheliale Stammzellen, retinales Pigmentepithel Stammzellen) und Krebszellen (Leukämie, Lymphome, Hirntumore und andere solide Tumoren)(59,73–76) im Auge: Endothel, RPE, Photorezeptorzellen(77)
CXCR5	reife B-Zellen, T-Helfer-Zellen(59,78)
CXCR7	Gehirn, Herz, Niere, Leber; Astrozyten, neutrophile Granulozyten(59,79)
CD44	Eher ubiquitäres Expressionsmuster: T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Granulozyten, Erythrozyten, Epithelzellen, Fibroblasten, Tumorzellen(59,80–82)
Ligand	Exprimiert von:
CXCL12	Lymphknoten, Knochenmark, Milz, Neuronen, meningeale Zellen, Endothel; aber weder ZNS noch Lymphozyten(74–76) im Auge: Endothel, RPE, Photorezeptorzellen(77)

CXCL13	Follikulardendritische Zellen in Lymphknoten, Milz und anderen sekundäre lymphatische Organen; aber weder ZNS noch Lymphozyten(75,83) im Auge: Retina, RPE, Endothel(84)
Hyaluronsäure (Hyaluronan)	ubiquitäres Expressionsmuster: Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix, synthetisiert durch Hyaluronan-Synthasen in der Plasmamembran von nahezu allen Zelltypen, auch von Krebszellen(82,85)

Diese Tabelle zeigt die Orte der Expression der Rezeptoren CXCR4, CXCR5, CXCR7 und CD44 sowie ihren Liganden CXCL12, CXCL13 und Hyaluronsäure.

1.3.4.1 Rezeptoren CXCR4 und CXCR7

CXCR4 wird vor allem von Lymphozyten, aber auch von vielen Organen, wie z.B. dem Gehirn, exprimiert. Die Organe exprimieren den Rezeptor vermehrt unter hypoxischen Bedingungen, aber auch wenn sie verletzt bzw. pathologisch verändert sind. Der Chemokin-Ligand CXCL12 ist ein homöostatisches Chemokin und dient u.a. in der Embryonalentwicklung als Wachstumsfaktor. Er wird auch vom Gehirn und von vielen anderen Organen ausgeschüttet. Stimulus hierfür ist die Hypoxie, ein Gewebeschaden oder auch ein Wachstumsstopp. Durch das Zusammenspiel von Rezeptor und Ligand kommt es zur Chemotaxis, aber auch zur Angiogenese und Proliferation.

CXCR4 ist ein G_i-Protein-gekoppelter Rezeptor. Durch die Bindung von CXCL12 dissoziieren die einzelnen Untereinheiten. Die alpha-Untereinheit kann bestimmte Proteinfamilien aktivieren, die letztendlich über den MEK1/2-ERK1/2-Signalweg zur Chemotaxis führen. Die beta-gamma-Untereinheit kann die Phospholipase C (PLC) aktivieren, die wiederum über den MEK-Signalweg zur Chemotaxis führt. Diese Untereinheit kann auch Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) aktivieren, die ihrerseits wiederum eine andere Proteinfamilie aktiviert, welche wiederum zur Chemotaxis führt. Alle Signalwege führen dazu, dass F-Aktin schnell polymerisiert und so eine Zellbewegung initiiert wird. Durch Ligandenbindung können indirekt auch Integrine aktiviert werden. Diese sind ebenfalls für das Homing verantwortlich. Nach Ligandenbindung wird die Signalkaskade normalerweise schnell gestoppt. Durch Phosphorylierung des intrazellulären C-Terminus wird die beta-Arrestin- und Clathrin-medierte Endozytose des Rezeptors angestoßen. CXCL12 kann auch an

CXCR7/ACKR3 binden, welches beta-Arrestin aktiviert, welches den Rezeptor CXCR4 direkt hemmt. Damit ist CXCR7, dessen Affinität zu CXCL12 10-mal höher ist als die von CXCR4, ein negativer Regulator von CXCR4(74,76,86).

1.3.4.2 Rezeptor CXCR5

Der Rezeptor CXCR5 ist eher spezifisch für B- und T-Lymphozyten. Sein Ligand CXCL13 wird von follikulär-dendritischen Zellen in Lymphknoten, Milz und anderen sekundär lymphatischen Organen exprimiert. Im Auge selbst finden sich unter physiologischen Bedingungen keine CXCR5-positiven Zellen. CXCL13 kann von der Retina, dem RPE und Endothel exprimiert werden(77). Die CXCL13-CXCR5-Achse dient in erster Linie zur Aufrechterhaltung der lymphofollikel-typischen Architektur. Dabei wird CXCL13 durch zuvor durch Lymphotoxin stimulierte follikulär-dendritische Zellen ausgeschüttet. Dieses Chemokine lockt daraufhin CXCR5-positive B-Zellen in den Follikel. Auf molekularer Ebene ähnelt die Signalkaskade stark der von CXCL12-CXCR4 und wird daher nicht erneut beschrieben(87).

1.3.4.3 Rezeptor CD44

Auch CD44, ein sog. Homing-Rezeptor, kann zur Metastasierung beitragen. Der Rezeptor zeigt ein ubiquitäres Expressionsmuster und wird auf hämatopoetischen Zellen, aber auch auf Epithelzellen und Fibroblasten exprimiert. Der Ligand von CD44 ist die Hyaluronsäure, welche ebenfalls eher ubiquitär exprimiert wird. Es gibt eine Hyaluronsäure-abhängige und -unabhängige Signalkaskade, die sich beide sehr ähneln. Wenn Hyaluronsäure (HA) an CD44 bindet, dann kann der Rezeptor in die Nähe anderer Signalling/Ko-Rezeptoren wie z.B. EGFR oder TGF- β -Rezeptoren gelangen. CD44 bindet nicht HA allein, es kann auch im Komplex mit RHAMM (receptor for hyaluron mediated motility) vorliegen. Der Ko-Rezeptor aktiviert weitere intrazelluläre Proteine wie Ras (kleine G-Proteine), ERK (MEK-Signalweg, Serin-Threonin-Kinase), PI3K, Akt (Proteinkinase), welche dann weitere Proteine aktivieren und letztendlich zu den aufgeführten Folgen führen. Auch die Proteinphosphatase 2A wird aktiviert, welche wiederum die anderen Kinasen inaktiviert und so einen Regulationsschritt darstellt. Über den PI3K-Signalweg kann es auch zu einem positiven Feedback-Mechanismus kommen, sodass vermehrt CD44 und RHAMM auf der Zelloberfläche exprimiert werden(88).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das primäre vitreoretinale Lymphom stellt Augenärzte und -ärztinnen vor eine große Herausforderung. Dieses ist schwer zu diagnostizieren und zu therapieren. Zudem ist das PVRL mit einer schlechten Prognose und mit einer kurzen Überlebenszeit assoziiert. Um betroffenen Patienten zu helfen, ist ein tieferes Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung unabdingbar. Um die Disseminationstheorie beim PVRL weiter zu untersuchen, wurde daher das erste PDX-Mausmodell für die Homing-Situation bei diesem Krankheitsbild genutzt, bei dem humane Lymphomzellen von primären ZNS-Lymphom-Patient:innen intrasplenisch und nicht direkt intravitreal injiziert wurden. Bei der Vergleichsgruppe wurden humane Lymphomzellen von sekundären ZNS-Lymphom-Patient:innen intrasplenisch appliziert(72).

Ziel dieser Arbeit war es, mit diesem PDX-Mausmodell eine PVRL-Situation herzustellen und dann die Augen hinsichtlich einer Infiltration mit CD20-positiven Zellen zu untersuchen. Weiterhin war es das Ziel, zu untersuchen, ob CD20-positive Lymphomzellen zusätzlich einen der vier Homingrezeptoren CXCR4, CXCR5, CXCR7 und CD44 ko-exprimieren. Die Expressionsstärke der Rezeptoren wurde zusätzlich mit einem immunreaktiven Score (IRS) (89) evaluiert. Die Arbeitshypothesen lauten:

1. CD20 und CXCR4 werden bei Mäusen mit einem primären B-Zell-Lymphombefall ko-exprimiert
2. CD20 und CXCR5 werden bei Mäusen mit einem primären B-Zell-Lymphombefall ko-exprimiert
3. CD20 und CXCR7 werden bei Mäusen mit einem primären B-Zell-Lymphombefall ko-exprimiert
4. CD20 und CD44 werden bei Mäusen mit einem primären B-Zell-Lymphombefall ko-exprimiert
5. CXCR4, CXCR5, CXCR7 und CD44 werden im Allgemeinen bei Mäusen mit einem primären B-Zell-Lymphombefall höher exprimiert als bei Mäusen mit einem sekundären B-Zell-Lymphombefall

2 Methoden

2.1 Beschreibung des Mausmodells

Das Mausmodell wurde in Freiburg im Breisgau von Fr. Dr. Lisa Isbell in Zusammenarbeit mit Cordula Tschuch und Julia Schüler von Charles River durchgeführt (Abb. 5). Die Augen des Mausmodells wurden uns dankenswerterweise mit ihrem und dem Einverständnis des Leiters der Arbeitsgruppe, Herr Professor von Bubnoff, zugesendet. Die Experimente wurden nach den Grundsätzen und Prinzipien der Deklaration von Helsinki der World Medical Association durchgeführt und von der Ethikkommission der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg (Registriernummer 91/14_170606, Titel „Xenograft Maus Modell von primären ZNS Lymphomen“, Tierantrags-Nummern G-18/78 und G-17/138 von Charles River) genehmigt.

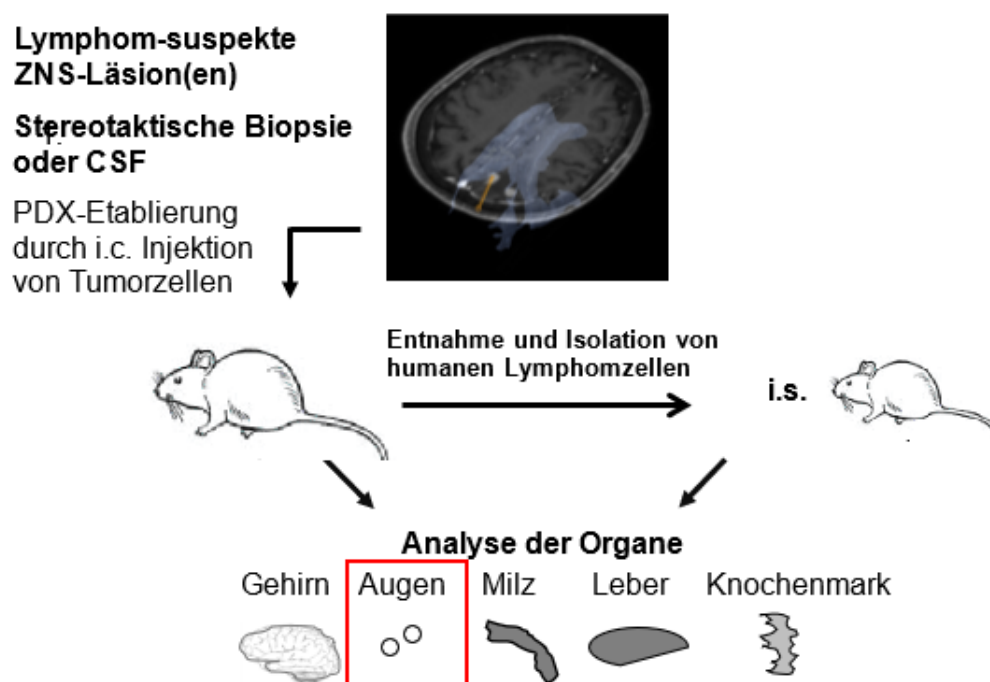
Für das Mausmodell wurden immunsupprimierte NSG Mäuse (NOD/Shi-scid/IL-2R^γnull; Charles River, Frankreich) genutzt. Die Mäuse tragen zum einen die SCID-Mutation (severe combined immunodeficiency), durch welche die Entwicklung von B- und T-Zellen stark eingeschränkt ist. Zum anderen entstammen die Mäuse einem speziellen Mausstamm, bei dem gehäuft Diabetes mellitus auftritt (NOD, non-obese diabetic). Bei diesen Mäusen besteht eine fehlerhafte Funktion der NK-Zellen.

Die Mäuse sind zum Zeitpunkt der Injektion 4-6 Wochen alt. Nach erfolgter Anästhesie der Mäuse mit Isofluran wurden humane Lymphomzellen intrasplenisch injiziert. Die Lymphomzell-Injektion wurde von der Firma Charles River Discovery Research Services (Freiburg im Breisgau, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden vorab die biopsierten Lymphomzellen durch ein Zellsieb (100 µm) gefiltert, um eine Zellsuspension zu erhalten. Für das PZNSL-Modell (4031) wurden humane ZNS-Biopsien eines PZNSL vom DLBCL-Typ und für das SZNSL-Modell (2958) wurden humane ZNS-Biopsien eines SZNSL vom DLBCL-Typ genutzt. Biopsien von männlichen Patienten wurden männlichen Mäusen injiziert. Umgekehrt wurden Biopsien von Patientinnen weiblichen Mäusen injiziert.

Nach dem Auftreten von Krankheitszeichen, wurden die Mäuse getötet und für weitere Untersuchungen u.a. die Augen entnommen und in Paraffin eingebettet. Zu

den Krankheitszeichen gehören unspezifische Zeichen wie stumpfes Fell und Nahrungsverweigerung. Spezifische Zeichen sind angeschwollene Bäuche, welche durch eine Splenomegalie hervorgerufen werden. Auch neurologische Zeichen sind möglich. Dazu gehören Lähmungserscheinungen, z.B. der Vorder- und Hinterpfoten. Teilweise wurde auch beobachtet, dass die Mäuse nicht mehr aufstehen konnten. Bei beiden Modellen wurden die Augen ca. 3 Wochen nach Injektion entnommen. Die in Paraffin eingebetteten Augenpaare wurden uns anschließend nach Lübeck geschickt und dort weiter aufbereitet.

Abb. 5: Herstellung des PDX-Mausmodells



Auf dieser Abbildung sind schematisch die einzelnen Arbeitsschritte zur Etablierung des PDX-Mausmodells dargestellt. Der orangene Pfeil zeigt in einer rekonstruierten MRT-Aufnahme eines Patienten mit einer suspekten ZNS-Läsion, typisch für ein Lymphom. Entnommene Lymphomzellen aus stereotaktischen Biopsien dieser Läsionen oder aus Liquor (CSF) wurden anschließend intrasplenisch (i.s.) in NSG-Mäuse injiziert. Nachdem sich die Tumorzellen in den Mäusen stabil vermehrten, wurden diese Zellen wieder entnommen und aufbereitet. Die Lymphomzellen wurden erneut i.s. in NSG-Mäuse injiziert. Anschließend wurden Gehirn, Augen, Milz, Leber und Knochenmark entnommen und weiter aufbereitet. Die Augen wurden von uns in Lübeck weiter untersucht. Abb. modifiziert nach Isbell et al.(72).

2.2 Materialien

2.2.1 Positivkontrollen

Alle Färbungen wurden auf Paraffinschnitten von humaner Tonsille durchgeführt (siehe Anhang, Abb. 23). Hierbei handelt es sich um ein sekundäres lymphatisches Organ, in dessen Lymphfollikeln viele B-Lymphozyten vorhanden sind. Diese tragen die zu untersuchenden Chemokin- und CD-Rezeptoren(75,78,80,90).

2.2.2 Antikörper

Tabelle 5: Primäre und sekundäre Antikörper

Primäre Antikörper	Firma & Katalognummer	Verdünnungsfaktor	Referenz	Sekundäre Antikörper	Firma & Katalognummer	Verdünnungsfaktor
CD20 goat anti-human	Abcam, Cambridge, UK (ab194970)	1:200	(91)	Donkey Anti-goat DyLight550	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA (SA5-10087)	1:200
CD44 rat anti-human/mouse	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA 14-0441-82	1:400	(92)	Donkey anti-rat AlexaFluor 488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA (A21208)	1:200
CXCR4 rat anti-mouse	Bio-Techne, Minneapolis, USA (MAB21651)	1:25	(93)			
CXCR5 rabbit anti-human/mouse	Abcam, Cambridge, UK (ab133706)	1:100	(94–97)	Donkey anti-rabbit DyLight488	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA (SA5-10038)	1:200
CXCR7 rabbit anti-human/mouse	Abcam, Cambridge, UK (ab72100)	1:200	(93)			

Übersicht über die genutzten primären und sekundären Antikörper sowie deren Hersteller, Katalognummern und den ermittelte optimale Verdünnungsfaktor.

2.2.3 Chemikalien

Tabelle 6: Chemikalien

Triton X-100	Serva, Heidelberg, Deutschland (39795)
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland (A4503)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen, Kalifornien, USA (D1306)
Alkohol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chlorwasserstoff (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland (1.09057.1000)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland (1.06586.0500)
Ethanol 99% vergällt (ChemSolute)	TH Geyer GmbH % Co. KG, Renningen, Deutschland (2212.5000)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA, C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland (8043.2)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA (10100147)
Glycerin	Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland (3783.1)
Goat Serum	Merck, Darmstadt, Deutschland (S26)
Kaliumchlorid (KCl)	Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland (HN02.2)
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Fluka Chemie Buchs, St. Gallen, Schweiz (60219)
Mowiol-488	Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland (0713.2)
Natriumchlorid (NaCl)	ChemSolute, Renningen, Deutschland (1367.5000)

Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland (1.06498.0500)
Tri-Natriumcitrat Dihydrat (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland (51804)
Tris-Hydrochlorid (C ₄ H ₁₁ NO ₃ · HCl)	Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland (9090.1)
Tween 20	Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland (P9416)
Xylol	J.T. Baker / Avantor, Radnor, Pennsylvania, USA

2.2.4 Angesezte Lösungen

Tabelle 7: Angesezte Lösungen

10x PBS Waschlösung	80,0g NaCl 2,0g KCl 11,5g Na ₂ HPO ₄ 2,0g KH ₂ PO ₄ In 1L Aqua dest.
1x PBS Waschlösung	100ml 10x PBS 900ml Aqua dest.
DAPI Gebrauchslösung	100 mL 1x PBS 20 µL DAPI Stammlösung
DAPI Stammlösung	5 mg/mL
Blockierungspuffer (für 200ml)	1,7892 g KCl 0,2338 g NaCl 2 ml 0.5 M EDTA 2 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5) 200 µL Triton X-100 (± 0,1%) 6 g BSA (± 3%)

	in 160 ml Aqua tridest / dest lösen, dann Gesamtvolumen auf 200ml einstellen, steril filtrieren
Mowiol zum Eindecken	6,0 g Glycerin 2,4 g Mowiol 4-88 6,0 mL Aqua dest., steril 12,0 mL 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5)
Natrium-Citrat-Puffer (pH 6.0)	2,94 g Tri-Sodium-Citrat (dihydrate) 1L Aqua dest. pH auf 6.0 einstellen (mit 1M HCl) 0,5ml Tween-20 dazugeben

2.2.5 Verbrauchsmaterial

Tabelle 8: Verbrauchsmaterial

Deckgläschen 24x20 mm	Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser 24x40 mm (Labsolute)	TH Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Falcons	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Filter	Schleicher & Schuell GmbH, Keene, New Hampshire, USA
Handschuhe (Micro-Touch Nitra-Tex)	Ansell Healthcare Europe N.V., Brüssel, Belgien
Objektträger superfrost plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA (J1800AMNZ)
Parafilm	American National Can, Neenah, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reagiergefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland

Transferpipetten	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
------------------	-------------------------------------

2.2.6 Laborwaren

Tabelle 9: Laborwaren

0,5 L Laborflaschen (Biochrom)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
0,5 L, 1L Laborflaschen (Duran)	Schott AG, Mainz, Deutschland
Bechergläser 25ml, 50ml (Duran)	Schott AG, Mainz, Deutschland
Diverse Glaswaren	Schott AG, Mainz, Deutschland TH Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Färbebänke	Alte Diakisten
Färbekästen, Objektträgerhalter (Rotilabo)	Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Färbetröge, Hellendahl	Brand, Wertheim, Deutschland
Färbezylinder	Brand, Wertheim, Deutschland
Messzylinder 1L, 100ml (Duran)	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
Petrischale aus Glas (Steriplan)	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland

2.2.7 Laborgeräte

Tabelle 10: Laborgeräte

Auflichtmikroskop Standard 20	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Autoklav (DX-23)	Systemec GmbH, Linden, Deutschland
Brutschrank	Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach, Deutschland
Eisschrank	Scotsman Ice Srl, Mailand, Italien
Eppendorf Pipetten (Reference) 10, 100, 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzkamera (Leica DFC350FX R2)	Leica, Wetzlar, Deutschland

Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI 6000 B)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank -20°C	Liebherr International GmbH, Bierbach, Deutschland
Kühlschränke 4°C	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland Liebherr International GmbH, Bierbach, Deutschland
Magnetrührer	Heidolph GmbH und Co KG, Deutschland
Mikrotom (Leica RM2165)	Leica, Wetzlar, Deutschland
Paraffinsteckbad (Typ 1052)	GFL, Lauda-Königshofen, Deutschland
PH-Meter	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Pipettierhilfe (PipetBoy acu)	INTEGRA Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Reiskocher (Multi Gourmet 31226)	Braun, Neu-Isenburg, Deutschland
Schüttler (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA
Tischzentrifuge	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Waagen	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland

2.2.8 Elektronische Datenverarbeitung

Tabelle 11: Für die elektronische Datenverarbeitung genutzte Programme

Bildauswertung (Fiji / Image J)	Version 1.53c, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA(98)
Bildnachbearbeitung (Gimp)	GNU Image Manipulation Program, Version 2.10.24
Literaturprogramm (Zotero)	Version 5.0.96.2, Roy Rosenzweig Center for History and New Media, Fairfax, Virginia, USA

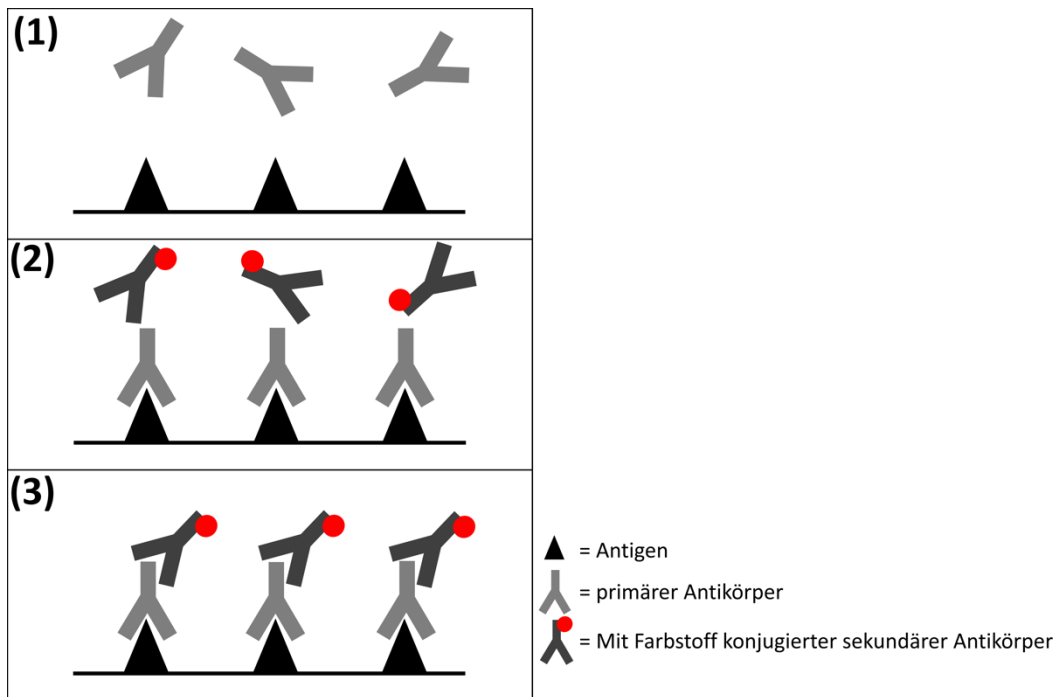
Mikroskopische Bildverarbeitung (LAS AF)	Leica Application Suite, advanced fluorescence, Version 2.7.0.9329, Leica, Wetzlar, Deutschland
Schreiben und Berechnungen (Microsoft Word und Excel)	Version 2107, Microsoft, Redmond, Washington, USA
Statistik und Graphik (GraphPad Prism)	Version 8.0.2, GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, USA

2.3 Allgemeine Methoden

Von den in Freiburg durchgeführten PDX-PZNSL bzw. PDX-SZNSL-Mausmodellen wurden paarweise die Augen entnommen und in Paraffin eingebettet. Die Blöcke wurden anschließend nach Lübeck in das Labor für experimentelle Ophthalmologie geschickt. Dort wurden aus den Blöcken mehrere Schnitte angefertigt, welche mittels indirekter Immunfluoreszenz angefärbt wurden (Abb. 6).

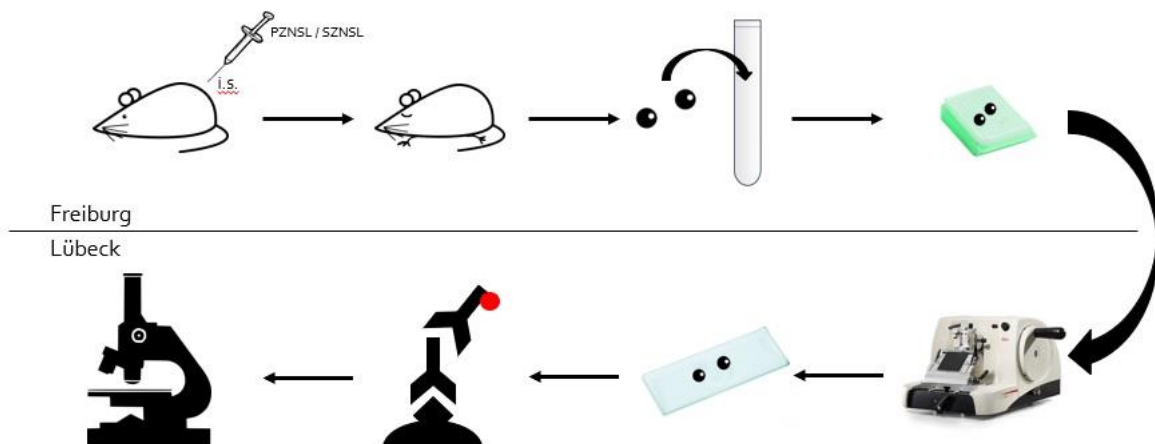
Es wurden insgesamt vier unterschiedliche indirekte Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen geplant: CD20 und CXCR4, CD20 und CXCR5, CD20 und CXCR7 sowie CD20 und CD44. Die Funktionsfähigkeit der Antikörper wurden mit Positivkontrollen auf humaner Tonsille überprüft (siehe Anhang, Abb. 23). Bei jeder Färbung wurde von jedem Augenpaar ein Schnitt gefärbt. D.h. pro Färbung wurden 10 Schnitte der SZNSL-Gruppe und 13 Schnitte der PZNSL-Gruppe gefärbt. Für jede Färbung wurden zwei Negativkontrollen mitgeführt, jeweils eine pro Gruppe. Für die Negativkontrollen wurden Mauseugen der PZNSL- bzw. SZNSL-Gruppe ohne primären Antikörper gefärbt. Insgesamt wurden folglich 100 Schnitte gefärbt. Alle benötigten Antikörper wurden mit mehreren Testfärbungen etabliert. Bei der Durchführung der Färbungen wurde sich, sofern möglich, nach den Protokollen und Vorgaben der Hersteller gerichtet. Die Antikörper wurden nach den Vorgaben der Hersteller gelagert. Für jede Färbung müssen zwei Tage geplant werden. Anschließend wurden die Schnitte mikroskopiert. Der gesamte Ablauf ist in Abb. 7 schematisch dargestellt.

Abb. 6: Das Prinzip der Indirekten Immunfluoreszenzfärbung



Die Abbildung zeigt schematisch den Ablauf der indirekten Immunfluoreszenzfärbung. Zu den Schnitten werden primäre Antikörper passend zu den Antigenen gegeben und anschließend inkubiert (1). Danach werden die Schnitte gewaschen und mit dem sekundären Antikörper, welcher mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert ist, inkubiert (2). Nach erneutem Waschen ergibt sich folgendes Bild: Die primären Antikörper binden am Antigen, die sekundäre Antikörper binden am primären Antikörper (3). Durch die Nutzung zweier Antikörper erhöht sich die Präzision einer Färbung.

Abb. 7: Schematischer Ablauf der Methodik



Zu sehen ist ein Schema, welches den Ablauf der Methodik darstellt. In Freiburg wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. von Bubnoff das genutzte Mausmodell etabliert(72). Dazu wurden Mäusen humane PZNSL- bzw. SZNSL-Zellen intrasplenisch (i.s.) gespritzt. Wenn die Mäuse Krankheitszeichen zeigten, wurden sie getötet und die Augen entnommen. Diese wurden anschließend mit Paraffin in Blöcke eingebettet. Diese wurden zu uns nach Lübeck gesendet. Hier wurden die Blöcke mit dem Mikrotom geschnitten und auf Objektträger aufgezogen. Es wurden doppelte Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert.

2.4 Vorbereitung der Proben

2.4.1 Anfertigung der Schnitte

Die in Freiburg enukleierten und in Paraffin eingebetteten Augenpaare wurden zu uns in das Labor für experimentelle Ophthalmologie geliefert. Dort wurden 5 µm dicke Schnitte mit dem Mikrotom angefertigt und auf Superfrost Objektträger aufgezogen.

2.4.2 Entparaffinierung

Zur weiteren Vorbereitung der Schnitte gehört weiterhin die Entparaffinierung. In diesem Schritt werden die Schnitte entparaffiniert und erneut hydriert. Hierfür wird die absteigende Alkoholreihe genutzt. Dazu werden die Schnitte für jeweils 5 Minuten in Xylol und Alkohol unterschiedlicher Konzentration getaucht. Die absteigende Alkoholreihe umfasst folgende Schritte: Dreimaliges Waschen in Xylol, anschließend zweimaliges Waschen in 100%igem Alkohol, es folgen einmalige Waschschrte in 90%igem Alkohol, 80%igem Alkohol, 70%igem Alkohol und 50%igem Alkohol. Als letztes werden die Schnitte 5 Minuten in Aqua dest. gewaschen.

2.5 Immunfluoreszenzfärbungen

2.5.1 CD20 und CXCR4

25 Schnitte (10 SZNSL und 1 Negativkontrolle; 13 PZNSL und 1 Negativkontrolle) wurden wie beschrieben entparaffiniert. Anschließend wurden die Schnitte in Citratpuffer pH 6.0 für 20 Minuten gekocht, um die Zielantigenstrukturen der Färbung zu demaskieren. Der Citratpuffer sollte zu diesem Zeitpunkt bereits 20 Minuten vorgekocht worden sein, damit die optimale Temperatur für den nachfolgenden Schritt erreicht ist. Nach dem Kochen verblieben die Schnitte für 30 Minuten im Citratpuffer, um abzukühlen.

Als Nächstes wurden alle Schnitte jeweils dreimal für 10 Minuten in PBS-Waschpuffer gewaschen. Nach dem Waschen musste die verbleibende Flüssigkeit vorsichtig vom Objektträger gewischt werden. Es folgte die Inkubation der Schnitte mit jeweils 50 µl des 5% FBS Blockierungspuffers für 30 Minuten in der feuchten Kammer. Durch diesen Schritt sollen unspezifische Antikörperbindungen

unterbunden werden. Während der Wartezeit wurde die Antikörperlösung mit den zwei primären Antikörpern gegen CD20 und CXCR4 angesetzt. Goat Anti-CD20 hat eine Verdünnung von 1:200, Rat Anti-CXCR4 hat eine Verdünnung von 1:25. Beide Antikörper wurden gemeinsam mit Blockierungspuffer angesetzt. Alle Schnitte wurden mit 30 µl Antikörperlösung und Parafilm bedeckt und über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wird der Parafilm entfernt und die Schnitte dreimal für jeweils 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Wichtig ist dabei, dass die Negativkontrollen getrennt von den anderen Schnitten gewaschen werden, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Nach dem Waschen wurden die Schnitte mit den sekundären Antikörpern, welche den Fluoreszenzfarbstoff tragen, inkubiert. Die Antikörper Donkey Anti-Goat (AlexaFluor 550) und Donkey Anti-Rat (AlexaFluor 488) haben beide eine Verdünnung von 1:200 und wurden zusammen in Blockierungspuffer angesetzt. Die Schnitte wurden jeweils mit 30 µl Antikörperlösung und Parafilm bedeckt und für eine Stunde bei 37°C in der feuchten Kammer inkubiert. Für alle nachfolgenden Färbeschritte musste darauf geachtet werden, dass auf die Schnitte möglichst wenig Licht fällt, da die Fluoreszenzfarbstoffe an den sekundären Antikörpern sowie DAPI lichtempfindlich sind.

Anschließend wurden die Schnitte erneut dreimal für jeweils 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Es folgt die Kernfärbung mit verdünnter DAPI-Lösung (1 µg/ml) für 8 Minuten. Nachfolgend wurden alle Schnitte erneut für jeweils 5 Minuten in PBS-Puffer gewaschen. Vor dem Eindecken mussten die Schnitte für 5 Minuten in Aqua dest. stehen. Als Letztes folgte das Eindecken mit Mowiol. Die Schnitte wurden anschließend lichtgeschützt bei 4°C gelagert und konnten am folgenden Tag mikroskopiert werden. Die Schnitte werden für 10 Jahre bis Oktober 2030 / Mai 2031 im Labor für experimentelle Ophthalmoskopie hinterlegt.

2.5.2 CD20 und CXCR5

Das Färbeprotokoll entspricht dem der vorher dargestellten Färbung von CD20 und CXCR4. Es wurde eine Doppelfärbung mit Antikörpern gegen CD20 und CXCR5

durchgeführt. Informationen zu Antikörpern und deren Verdünnungen können aus Tabelle 5 entnommen werden.

2.5.3 CD20 und CXCR7

Das Färbeprotokoll entspricht dem der vorher dargestellten Färbung von CD20 und CXCR4. Es wurde eine Doppelfärbung mit Antikörpern gegen CD20 und CXCR7 durchgeführt. Informationen zu Antikörpern und deren Verdünnungen können aus Tabelle 5 entnommen werden.

2.5.4 CD20 und CD44

Das Färbeprotokoll entspricht dem der vorher dargestellten Färbung von CD20 und CXCR4. Es wurde eine Doppelfärbung mit Antikörpern gegen CD20 und CD44 durchgeführt. Informationen zu Antikörpern und deren Verdünnungen können aus Tabelle 5 entnommen werden. Der Antikörper reagiert mit allen Isoformen von CD44.

2.6 Mikroskopieren und Bildaufnahmen

2.6.1 Mikroskopische Bildauswertung

Die Schnitte wurden möglichst zeitnah nach den erfolgten Färbungen mikroskopiert. Dazu wurde das Leica-Mikroskop DMI 6000 B mit der Fluoreszenzkamera Leica DFC350FX R2 genutzt. Die Bildaufnahmen und die Mikroskop- und Kameraeinstellungen wurden mit dem Programm LAS AF vorgenommen.

Folgende Filter wurden genutzt:

- Für die Kernfärbung (DAPI): A4
- Für Alexa Fluor 550: Y3
- Für Alexa Fluor 488: L5
- Für DyLight 488: L5

Tabelle 12: Liste der genutzten Filter und deren Eigenschaften

Filter	Anregungsfilter	Dichroitischer Spiegel	Sperrfilter
A4	BP 360/40	400	BP 470/40
L5	BP 480/40	505	BP 527/30
Y3	BP 545/30	565	BP 610/75

Dargestellt sind die Eigenschaften bzw. Einstellungen der genutzten Filter am Fluoreszenzmikroskop, welche benötigt werden, um die Fluoreszenz sichtbar zu machen. Durch den Anregungsfilter wird die benötigte Wellenlänge herausgefiltert. Da in diesem Wellenlängenbereich dennoch mehrere Fluoreszenzfarben entstehen, wird mit dem Sperrfilter der Wellenlängenbereich erneut angepasst. Der dichroitische Spiegel lenkt das einfallende Licht ohne Verlust der Fluoreszenz in das Objektiv. Der Bandpassfilter (BP) lässt nur bestimmte Wellenlängen eines Frequenzbereichs hindurch.

Weitere Einstellungen zu den einzelnen Färbungen werden in nachfolgender Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Darstellung der vorgenommenen Einstellungen am Mikroskop

Färbekomponenten	Belichtung / ms	Verstärkung	Intensität / %	Hintergrund
CD20	580	3,3	100	450 / 4093
CD44	960	3,2	100	128 / 4093
CXCR4	932	3,1	100	337 / 4093
CXCR5	775	3,4	100	177 / 4093
CXCR7	730	3,0	100	80 / 4093
DAPI	207	2,9	100	0 / 4093

Die Tabelle zeigt die vorgenommenen Einstellungen am Mikroskop. Die Belichtungszeit wird in Millisekunden (ms) angegeben. Die (Farb-)Verstärkung ist ein einheitenloser Wert. Die Intensität ist in % angegeben. In der letzten Spalte ist die Nachbearbeitung der Bilder gezeigt, welche vor allem die Hintergrundfärbung etwas reduziert. Die Werte beziehen sich auf die Rot-Grün-Blau-Skala. Normalerweise umfasst die Skala Werte von 0 bis 4093. Pixel mit dem Wert 0 sind schwarz. Ist nun dieser erste Wert erhöht, werden alle Pixel bis zu jenem Wert ebenfalls schwarz

Von jedem Augenpaar wurden Aufnahmen in 200-facher Vergrößerung von folgenden Strukturen angefertigt:

- Choroidea
- Retina
- Sehnerv
- Ziliarkörper

Während des Mikroskopierens wurde anhand der Färbung gegen CD20, einem B-Zell-Lymphommarker, festgehalten, ob die Augen eine Infiltration aufwiesen.

2.6.2 Manuelle Zellzählung

Um den Anteil der Zellen mit einer Ko-Expression von Homing-Rezeptor und CD20 an allen CD20-positiven Zellen anzugeben, wurden alle Aufnahmen der Choroidea der PZNSL-Augen mit Hilfe von ImageJ (Version 1.52a) manuell ausgezählt.

2.6.3 Bildbearbeitung

Die Aufnahmen wurden mit dem Bildbearbeitungsprogramm GIMP (GNU Image Manipulation Program, Version 2.10.24) bearbeitet. Die vorgenommenen Einstellungen können Tabelle 14 entnommen werden. Anschließend wurden die einzelnen Kanäle (Rot-grün-blau, RGB) mit dem Programm ImageJ (Version 1.52a) zusammengestellt, sodass ein Bild vom Typ RGB-Stack entsteht. Der Bildtyp wurde in RGB umgewandelt. Die Retinae wurden beschriftet (GCL = Ganglienzellschicht, ONL = äußere Körnerschicht, INL = innere Körnerschicht). Weiterhin wurden ko-exprimierende Zellen, CD20-positive und CD44-positive Zellen mit Pfeilen markiert. Der Ziliarkörper wurde mit einem Sternchen gekennzeichnet. Der Maßstab wurde mit 150 Pixeln, entspricht 50 µm, festgelegt und ebenfalls in die Bilder eingefügt. Grundlage der Auswertung sind die unbearbeiteten Rohdaten der Aufnahmen.

Tabelle 14: Bildbearbeitung

RGB-Kanal	Schwarzwert	Belichtung
CD20 – Y3 (rot)	0,008	1,000
CD44 – L5 (grün)	0,003	1,869
CXCR4 – L5 (grün)	0,002	2,944
CXCR5 – L5 (grün)	0,002	3,220
CXCR7 – L5 (grün)	0,002	1,449
DAPI – A4 (blau)	0,030	0,000

Dargestellt sind die mit GIMP vorgenommenen Parameter der Bildbearbeitung. Die erste Spalte zeigt die bearbeiteten Komponenten. Nicht aufgeführte Komponenten wurden original belassen. Der Schwarzwert reduziert die Hintergrundfärbung, die Belichtung (= relative Helligkeitsänderung in Blendenzahlen) erhöht die Intensität, vor allem der Pixel im Mitteltonbereich.

2.7 Auswertung mit dem immunreaktiven Score

Um die Expression der Homing-Rezeptoren beider Gruppen statistisch vergleichen zu können, wurden alle Schnitte mit einem semiquantitativen Score ausgewertet. Der sogenannte immunreaktive Score nach Semmele und Stegner (IRS) wird

normalerweise für Östrogen- und Progesteronrezeptoren beim Mamma-Karzinom angewandt, kann aber genauso für alle anderen Zellen genutzt werden(99,89). Der IRS wird wie folgt erhoben: Die Farbintensität wird mit der Anzahl der positiven Zellen in Prozent (in einer repräsentativen Aufnahme) multipliziert, dieses Ergebnis ist der immunreaktive Score (IRS). Dabei werden sowohl die Intensität als auch die Anzahl der Zellen vom Untersucher abgeschätzt. Daher sollte eine Färbereihe an einem Tag gemessen werden, um den Fehler zu minimieren. Diese Methode ist für diese Schnitte sehr gut geeignet, denn bei einem Auge, bei dem nachweislich keine Lymphomzellen vorhanden sind, ist der IRS immer 0 und damit eindeutig negativ. Bei einer reinen Intensitätsmessung würde die unterschiedlich starke Hintergrundfärbung verfälschte Werte liefern.

Folgende Tabelle 15 stellt die Erhebung des IRS dar.

Tabelle 15: Immunreaktiver Score

Farbintensität	Anzahl der positiven Zellen / %	immunreaktiver Score (IRS)
0 = keine Reaktion	0 = keine	0 = negativ
1 = schwache Reaktion	1 = unter 10%	1-3 = schwach positiv
2 = mäßige Reaktion	2 = 10-50%	4-8 = mäßig positiv
3 = starke Reaktion	3 = 51-80%	9-12 = stark positiv
	4 = mehr als 80%	

Dargestellt ist die Ermittlung des immunreaktiven Scores (IRS) aus der Farbintensität und der Anzahl der positiven Zellen in Prozent. Durch die Einschätzung des Untersuchers werden Intensität und Anzahl der Zellen ganzzahlige Werte zugeordnet, die dann miteinander multipliziert werden und so den IRS bilden. Dieser kann die Werte 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 12 annehmen und dient als Bewertungsskala zur Quantifizierung von Rezeptoren(89).

Für Choroidea, Retina, Sehnerv und Ziliarkörper wird pro Auge pro Färbung ein Wert erhoben. So ergeben sich pro Schnitt, auf dem jeweils ein Augenpaar aufgezogen ist, zwei Werte. Da der IRS eine ordinal verteilte Größe ist, wird aus den beiden Werten der Median berechnet. So ergeben sich, wenn alle Strukturen angeschnitten sind und ausgewertet werden konnten, in der SZNSL-Gruppe 10 Mediane und in der PZNSL-Gruppe 13 Mediane pro ausgewerteter Struktur pro angefärbtem Rezeptor. Mit dem IRS lassen sich nicht nur Unterschiede hinsichtlich der Expressionsstärke von Homing-Rezeptoren beider Gruppen, sondern auch die Gleichartigkeit der Infiltration beider Augen eines Augenpaares darstellen. Die

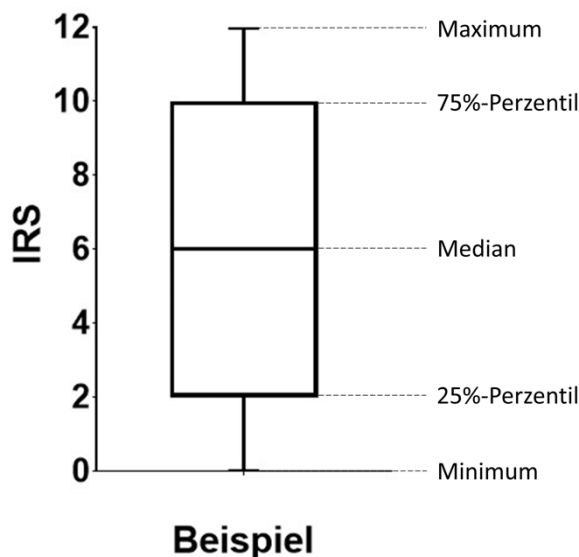
erhobenen IRS-Werte wurden im Vier-Augen-Prinzip (PD Dr. Kakkassery) besprochen und reevaluiert.

2.8 Statistik

Für die statistische Auswertung werden die IRS-Werte der SZNSL-Gruppe (n=10) und der PZNSL-Gruppe (n=13) miteinander verglichen. Augen, bei denen bestimmte Strukturen nicht darstellbar waren und daher nicht ausgewertet werden konnten, wurden von den Berechnungen ausgeschlossen.

Die Nullhypothese lautet: Die Verteilung der IRS-Werte der Rezeptoren CD20, CXCR4, CXCR5, CXCR7 und CD44 ist bei der SZNSL-Gruppe identisch zur Verteilung der PZNSL-Gruppe. Die Alternativhypothese lautet: Beide Verteilungen haben einen unterschiedlichen Schwerpunkt. Die statistische Auswertung der IRS-Daten wurde mit dem Programm GraphPad Prism (Version 8.0.2.) durchgeführt. Für die deskriptive Statistik wurden aus den ordinal verteilten IRS-Werten der Median, die Spannweite, Maximum, Minimum sowie die 25%- und die 75%-Perzentile berechnet. Zur Ermittlung der Verteilung der Daten wurden Box-Plots (als Beispiel siehe Abb. 8) angelegt.

Abb. 8: Beispiel der Darstellung eines Box-Plots



Dargestellt ist beispielhaft der Aufbau eines Box-Plots, wie er in dieser Arbeit immer wieder vorkommt. Die obere Grenze der Box wird durch das 75%-Perzentil der Messwerte bestimmt, entsprechend ist die untere Grenze der Box das 25%-Perzentil. Der Median befindet sich innerhalb der Box. Die obere bzw. untere Klammer entsprechen dem maximalen bzw. minimalen Wert der Messreihe.

Als statistischer Test wurde der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben angewandt, da dieser für ordinalskalierte Größen angewendet werden kann. p-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant angenommen. Alle statistischen Berechnungen wurden von der Autorin selbstständig durchgeführt.

3 Ergebnisse

Wesentliche in dieser Dissertation gewonnene Daten wurden von der Autorin im International Journal of Molecular Science im Oktober 2022 publiziert (100).

3.1 Expression von CD20 in SZNSL- und PZNSL-Augen

Die subjektive Auswertung der Expression von CD20 in beiden Mausmodellgruppen ergab Folgendes: In der SZNSL-Gruppe fanden sich in 0/10 Augenpaaren CD20-positive Zellen. In der PZNSL-Gruppe fanden sich unabhängig vom Gewebe im Auge in 11/13 CD20-positive Zellen. Die meisten CD20-positiven Zellen der PZNSL-Gruppe waren in der Choroidea lokalisiert. Die mitgeführten Negativkontrollen zeigten keine unspezifischen Bindungen. Tabelle 16 fasst die Anzahl der Augen der PZNSL-Gruppe mit und ohne Infiltration nach Lokalisation geordnet zusammen.

Tabelle 16: Anzahl der Augenpaare der PZNSL-Gruppe mit und ohne Infiltration

	Infiltration	Keine Infiltration	Nicht auswertbar
Choroidea	11	2	0
Retina	7	6	0
Ziliarkörper	4	9	0
Sehnerv	4	4	5

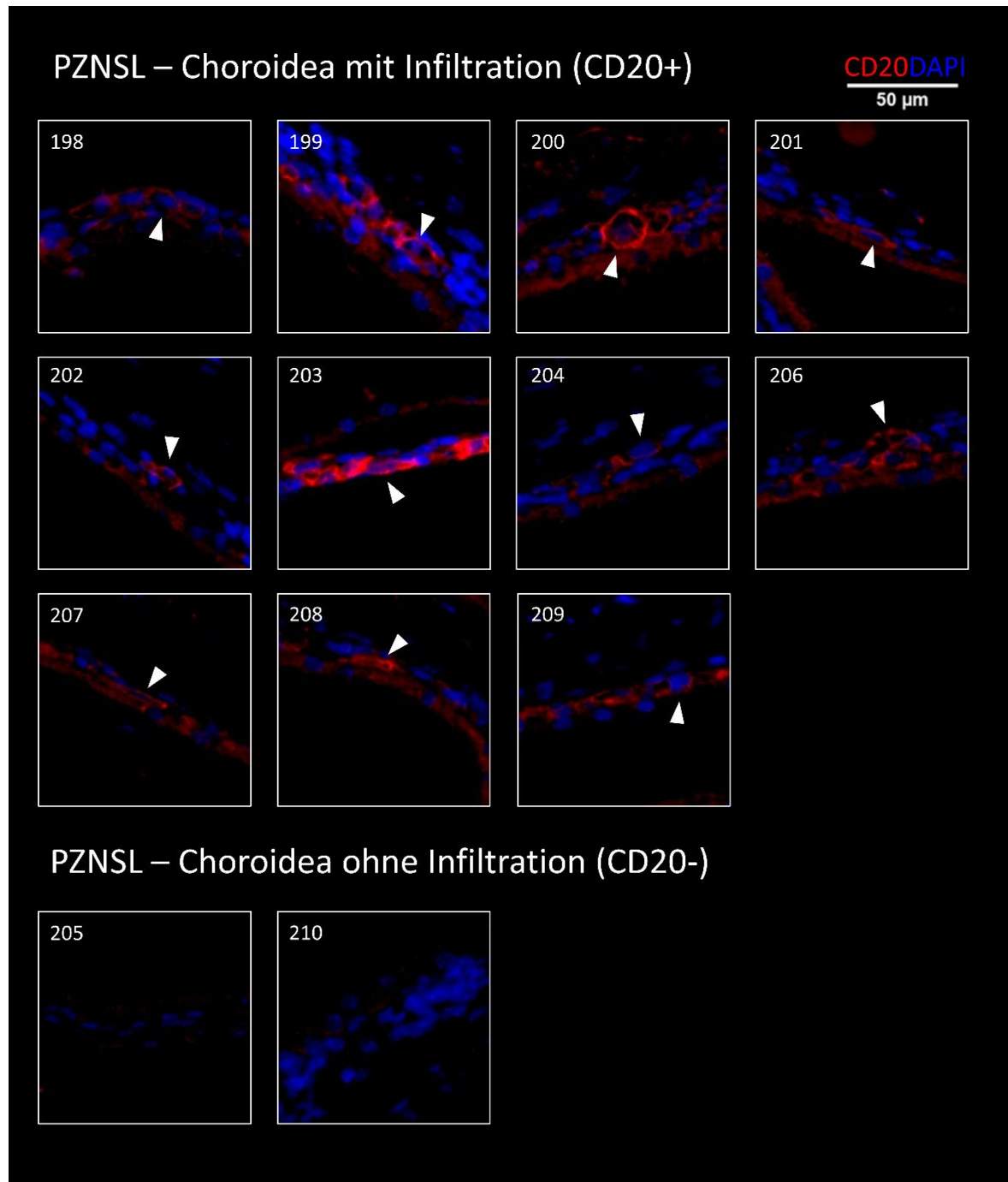
Diese Tabelle zeigt die Anzahl der Augenpaare der PZNSL-Gruppe mit und ohne Infiltration bzw. nicht auswertbaren Augen nach Lokalisation geordnet auf.

3.1.1 Lokalisation der CD20-positiven Zellen

In der SZNSL-Gruppe waren unabhängig von der Lokalisation keine CD20-positiven Zellen zu finden. Lediglich der Sehnerv zeigte vereinzelt positive Signale (siehe Anhang, Abb. 24). Die meisten CD20-positiven Zellen waren in der Choroidea der PZNSL-Gruppe lokalisiert. Hier zeigten 11/13 Augenpaaren eine Infiltration (Abb. 9). Die CD20-positiven Zellen der Choroidea waren im Vergleich zu den anderen Strukturen zudem am stärksten angefärbt. In der PZNSL-Retina hingegen waren nur vereinzelt Zellen CD20-positiv. Hier zeigten 7/13 Augenpaaren vereinzelte schwach angefärbte CD20-positive Zellen (Abb. 10). Es fanden sich auch vereinzelt Lymphomzellen subretinal. Vergleichbar mit der Retina waren im Ziliarkörper kaum CD20-positive Zellen zu finden. Hier waren 4/13 Augenpaaren mit einzelnen CD20-

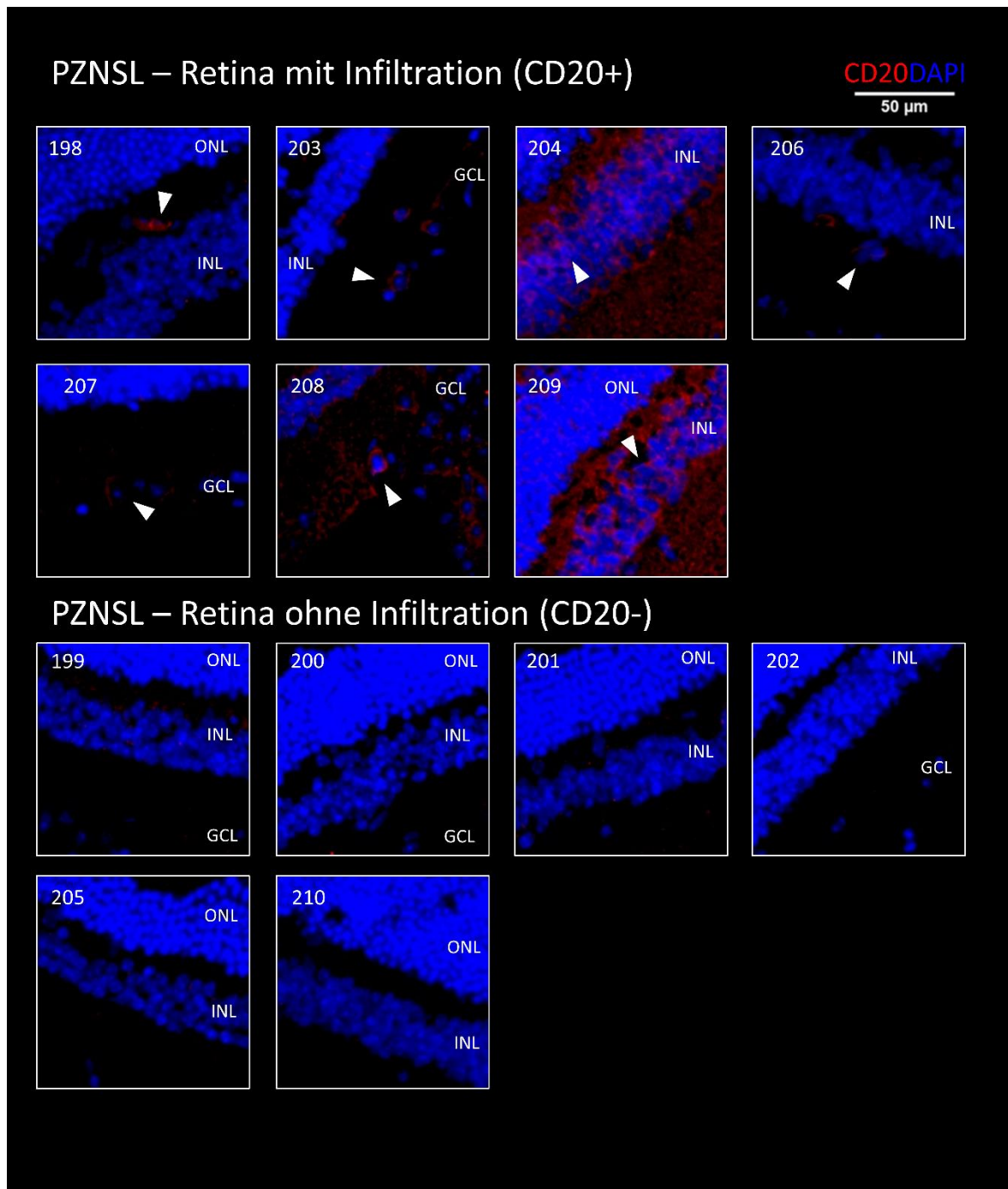
positiven Zellen infiltriert. Weiterhin fanden sich vereinzelte CD20-positive Zellen im bindegewebigen Stroma. Im Sehnerv fanden sich in 4/8 Fällen CD20-positive Zellen. In 5 Augenpaaren war der Sehnerv nicht vorhanden bzw. nicht angeschnitten.

Abb. 9: Infiltration der Choroidea der PZNSL-Gruppe



Dargestellt sind Ausschnitte von Aufnahmen der Choroideae der PZNSL-Gruppe, in der 11/13 Augen mit CD20-positiven Zellen (rot angefärbt) infiltriert waren. Positive Zellen sind exemplarisch mit weißen Pfeilen markiert. Scale bar 50 µm

Abb. 10: Infiltration der Retina der PZNSL-Gruppe



Auf dieser Abbildung sind Ausschnitte von Aufnahmen der Retinae der PZNSL-Gruppe zu sehen. 7/13 Augenpaaren zeigten eine Infiltration mit Rot angefärbten CD20-positiven Zellen, welche sich in nahezu allen Schichten der Retina fanden. Positive Zellen sind exemplarisch mit weißen Pfeilen markiert. ONL = outer nuclear layer, INL = inner nuclear layer, GCL = ganglion cell layer, Scale bar 50 µm

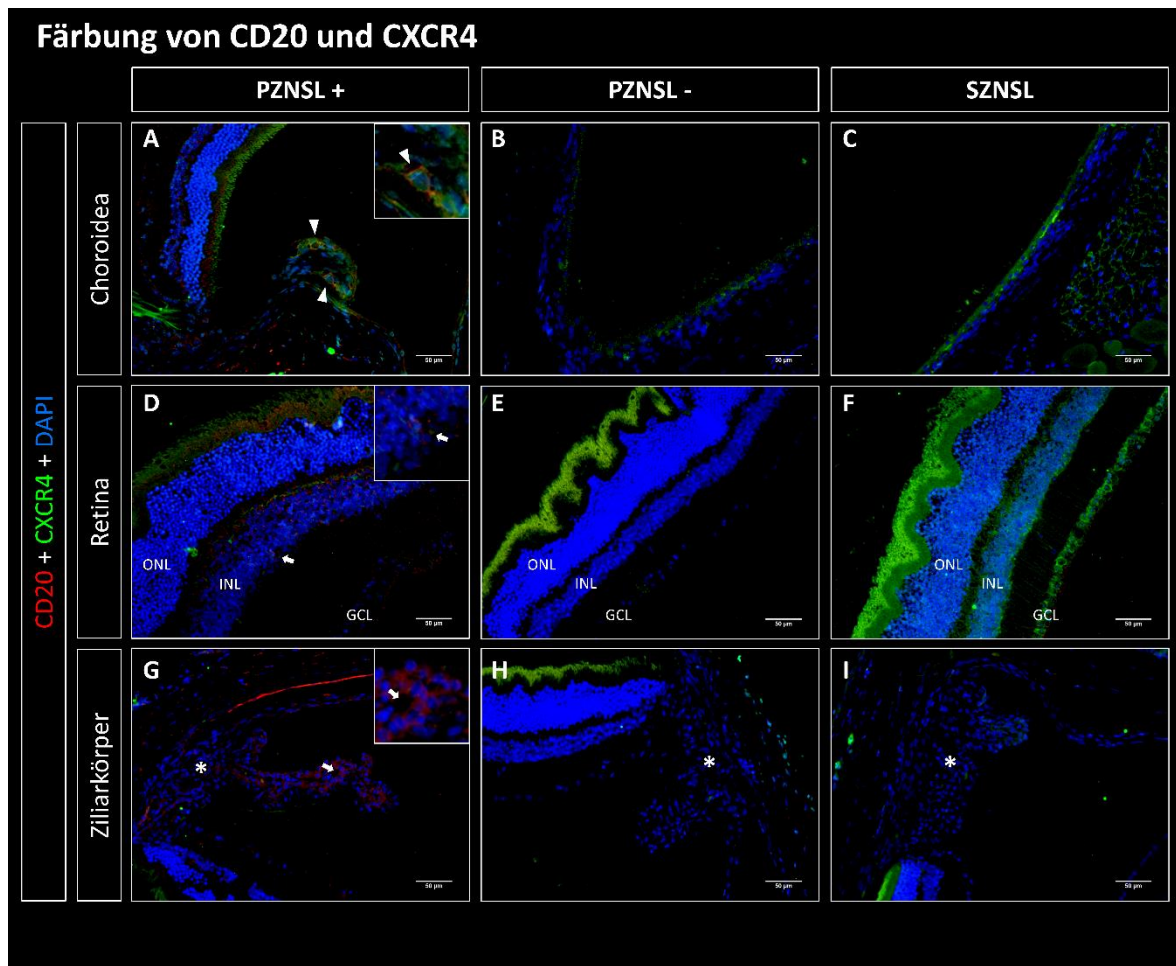
3.1.2 Vorkommen von CD20/Homingrezeptor-positiven Zellen

Ziel der Durchführung von Doppelfärbungen von CD20 mit jeweils einem der vier Homing-Rezeptoren CXCR4, CXCR5, CXCR7 und CD44 war es, herauszufinden,

ob es Zellen gibt, die beides exprimieren. In der SZNSL-Gruppe gab es keine Zellen, die CD20 und einen der Homing-Rezeptoren ko-exprimierten, da es keine CD20-positiven Zellen in dieser Gruppe gab. In der PZNSL-Gruppe wurden doppelt positive Zellen gefunden, wenn sich diese auch vorrangig in der Choroidea befanden. Dabei handelte es sich vor allem um Zellen, die entweder CD20/CXCR4 (Abb. 11) oder CD20/CXCR5 (Abb. 12) exprimierten. CD20/CD44-positive Zellen wurden nur vereinzelt gefunden (Abb. 14). Hier fanden sich eher rein CD44-positive Zellen in Blutgefäßen in unmittelbarer Nähe zu CD20-positiven Zellen. CD20/CXCR7-positive Zellen gab es kaum (Abb. 13). Eine genauere Auswertung ist nachfolgend mit Hilfe des IRS zu finden.

3.1.2.1 Doppelfärbung CD20 und CXCR4

Abb. 11: Doppelfärbung von CD20 und CXCR4

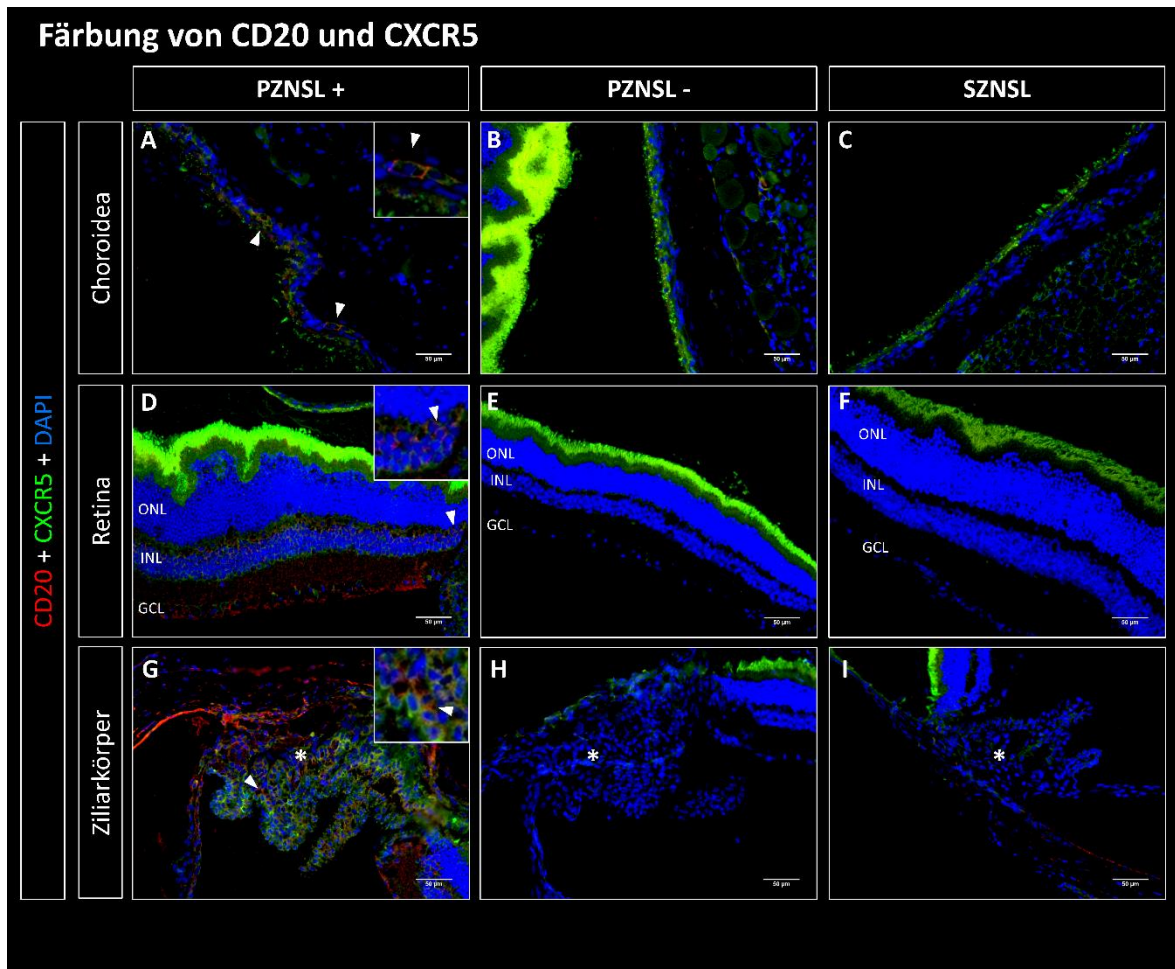


Exemplarisch dargestellt sind Aufnahmen der Färbung von dem Lymphommarker CD20 (rot) und dem Chemokinrezeptor CXCR4 (grün). A-C zeigt Aufnahmen der Choroidea, D-F der Retina und G-I des Ziliarkörpers (markiert mit *). A, D und G zeigen jeweils die Choroidea, Retina und Ziliarkörper von Mausaugen, die mit CD20-positiven primären ZNS-Lymphomzellen (PZNSL+) infiltriert sind. In der Choroidea (A) sind

CD20/CXCR4-positive Zellen zu finden (Dreiecke). In der PZNSL+ Retina und dem PZNSL+ Ziliarkörper sind vereinzelt CD20-positive Zellen zu finden (Pfeil). B, E und H zeigen die Choroidea, Retina und Ziliarkörper von Mausaugen aus der PZNSL-Gruppe, die aber nicht mit Lymphomzellen infiltriert sind (PZNSL-). Hier wurden keine CD20-positiven und wenige CXCR4-positive Zellen gefunden. In C, F und I sind Choroidea, Retina und Ziliarkörper der SZNSL-Gruppe gezeigt. Hier findet sich keine Infiltration mit CD20-positiven Lymphomzellen. Im Gegensatz zu den anderen Gruppen ist die Ganglienzellschicht der Retina (F) häufig CXCR4-positiv(100). ONL = outer nuclear layer, INL = inner nuclear layer, GCL = ganglion cell layer, Scale bar 50 µm

3.1.2.2 Doppelfärbung CD20 und CXCR5

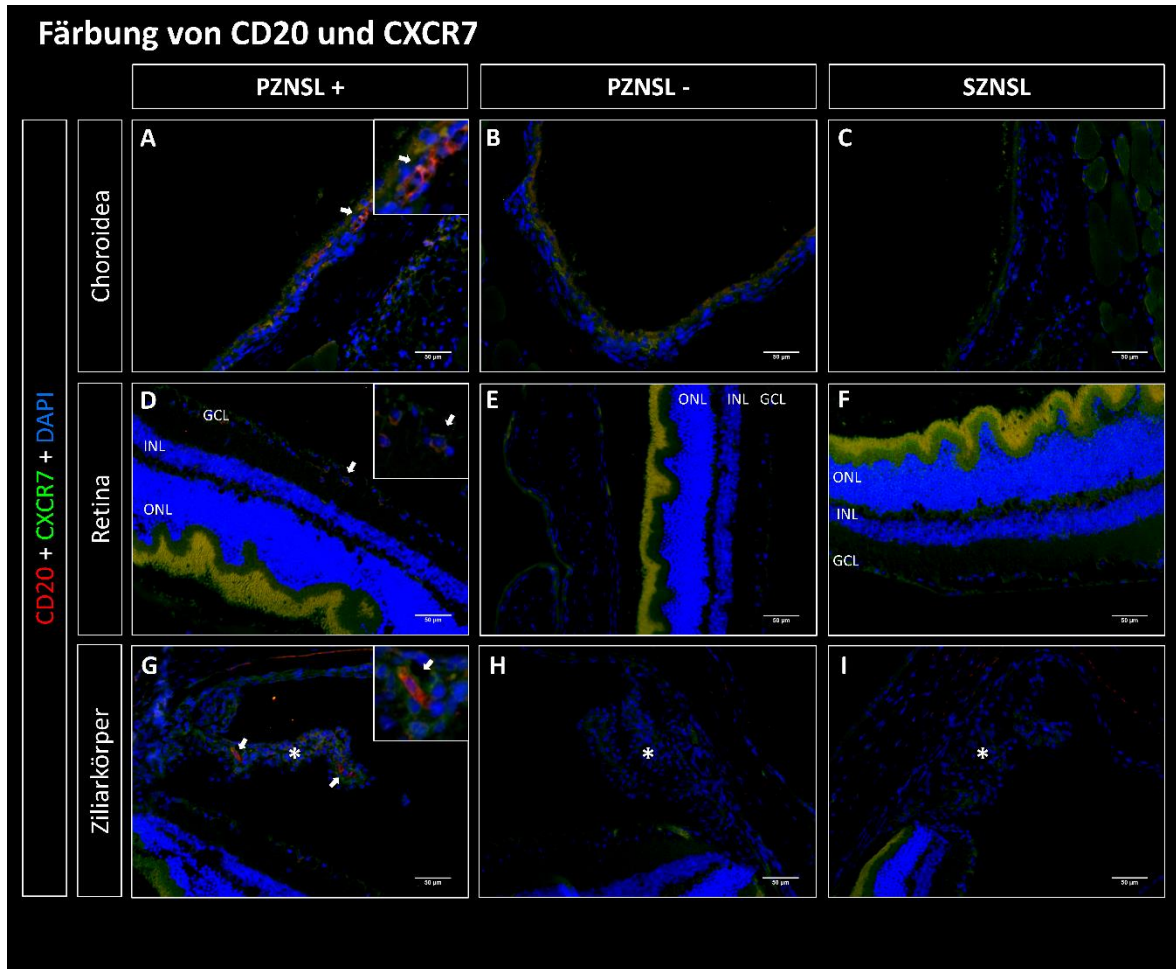
Abb. 12: Doppelfärbung von CD20 und CXCR5



Exemplarisch dargestellt sind Aufnahmen der Färbung von dem Lymphommarker CD20 (rot) und dem Chemokinrezeptor CXCR5 (grün). A-C zeigt Aufnahmen der Choroidea, D-F der Retina und G-I des Ziliarkörpers (markiert mit *). A, D und G zeigen jeweils die Choroidea, Retina und Ziliarkörper von Mausaugen, die mit CD20-positiven primären ZNS-Lymphomzellen (PZNSL+) infiltriert sind und zusätzlich CXCR5 exprimieren (Dreiecke). In der PZNSL- Gruppe (B, E und H) und in der SZNSL-Gruppe (C, F und I) fanden sich weder CD20- noch CXCR5-positive Zellen(100). ONL = outer nuclear layer, INL = inner nuclear layer, GCL = ganglion cell layer, Scale bar 50 µm

3.1.2.3 Doppelfärbung CD20 und CXCR7

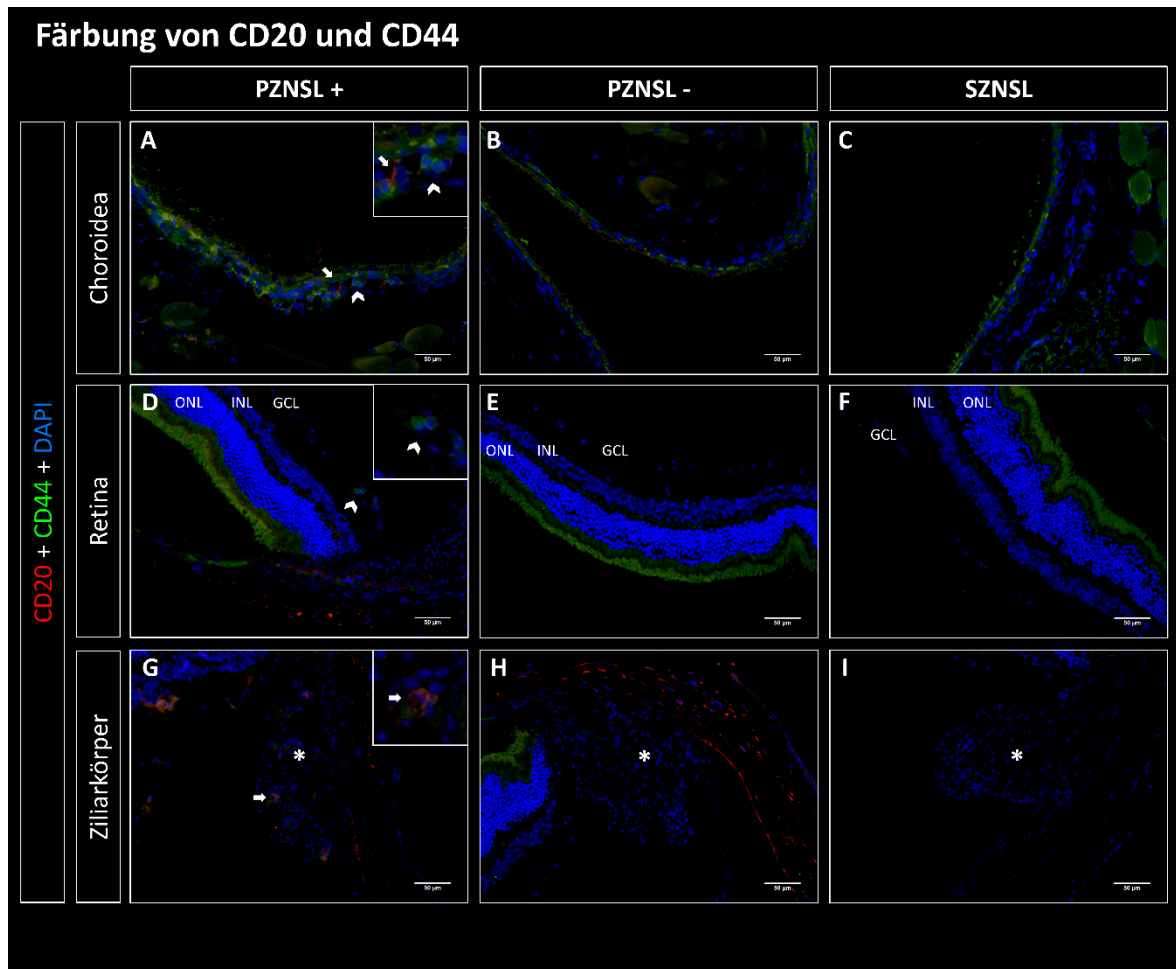
Abb. 13: Doppelfärbung von CD20 und CXCR7



Exemplarisch dargestellt sind Aufnahmen der Färbung von dem Lymphommarker CD20 (rot) und dem Chemokinrezeptor CXCR7 (grün). A-C zeigt Aufnahmen der Choroidea, D-F der Retina und G-I des Ziliarkörpers (markiert mit *). A, D und G zeigen jeweils die Choroidea, Retina und Ziliarkörper von Mäusen, die mit CD20-positiven primären ZNS-Lymphomzellen (PZNSL+) infiltriert sind (Pfeile). Es waren kaum CXCR7-positive Zellen angefärbt. In der PZNSL- Gruppe (B, E und H) und in der SZNSL-Gruppe (C, E und I) fanden sich keine CD20-positiven Zellen. CXCR7 war in der Choroidea der PZNSL- (B) und der SZNSL Gruppe (C) schwach angefärbt. In der Retina der PZNSL- (E) und der SZNSL Gruppe (F) war CXCR7 schwach bis mäßig angefärbt. Im Ziliarkörper der nicht infiltrierten Gruppen (H und I) war CXCR7 mäßig stark angefärbt(100). ONL = outer nuclear layer, INL = inner nuclear layer, GCL = ganglion cell layer, Scale bar 50 μ m r

3.1.2.4 Doppelfärbung CD20 und CD44

Abb. 14: Doppelfärbung von CD20 und CD44



Exemplarisch dargestellt sind Aufnahmen der Färbung von dem Lymphommarker CD20 (rot) und dem „Homingrezeptor“ CD44 (grün). A-C zeigt Aufnahmen der Choroidea, D-F der Retina und G-I des Ziliarkörpers (markiert mit *). A, D und G zeigen jeweils die Choroidea, Retina und Ziliarkörper von Mausaugen, die mit CD20-positiven primären ZNS-Lymphomzellen (PZNSL+) infiltriert sind (Pfeile). A zeigt CD44-positive Zellen (Chevron Pfeil), welche sich oft in Kapillaren in unmittelbarer Nähe zu den CD20-positiven Lymphomzellen befanden. In der Retina (D) fanden ebenfalls CD44-positive Zellen in Kapillaren. Im Ziliarkörper fanden sich weniger CD44-positive Zellen. In der PZNSL- Gruppe (B, E und H) und in der SZNSL-Gruppe (C, F und I) fanden sich in Choroidea, Retina und Ziliarkörper keine CD20-positiven und selten CD44-positive Zellen(100). ONL = outer nuclear layer, INL = inner nuclear layer, GCL = ganglion cell layer, Scale bar 50 µm

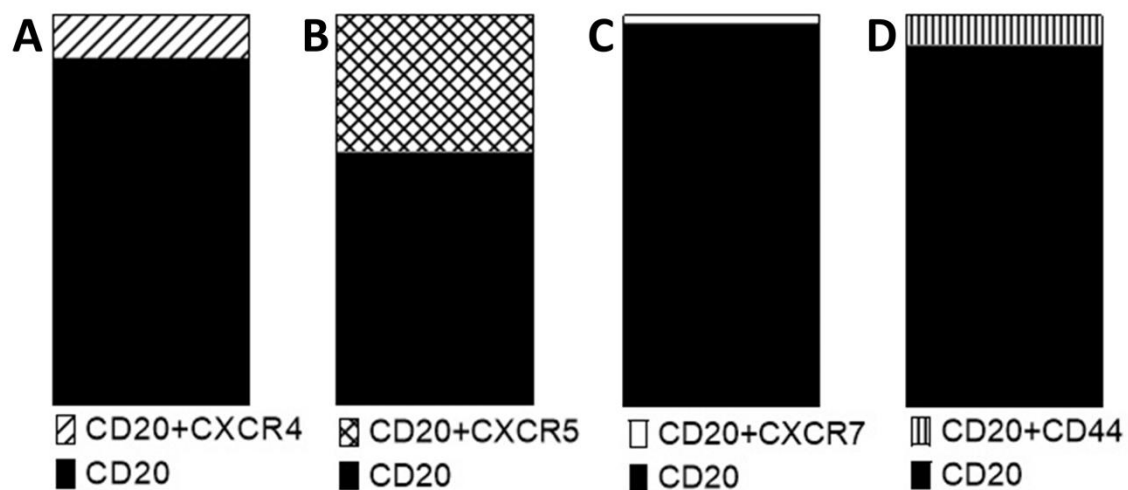
3.1.3 Anteil der ko-exprimierenden Zellen an allen CD20-positiven Zellen in der Choroidea

Bei allen Aufnahmen der PZNSL-Augen von der Choroidea wurden sowohl alle CD20-positiven Zellen als auch alle Zellen mit Ko-Expression von Homing-Rezeptor und CD20 ausgezählt, um einen Anteil anzugeben (Abb. 15). Die Auszählung der Zellen ergab Folgendes: Über alle PZNSL-Augen zeigen in der Choroidea 21/138

Zellen (ca. 15%) der CD20-positiven Zellen zusätzlich eine Ko-Expression mit CXCR4. Die Färbung von CD20 und CXCR5 zeigte, dass 32/91 (ca. 35%) CD20-positiven Zellen zusätzlich CXCR5 exprimierten. Die Färbungen von CD20/CXCR7 und CD20/CD44 zeigten kaum ko-exprimierende Zellen. Von 152 CD20-positiven Zellen zeigten 3 zusätzlich eine Expression mit CXCR7 (ca. 2%). Bei der Färbung von CD20 und CD44 exprimierten 10/132 (ca. 8%) CD20-positiven Zellen ebenfalls CD44.

Abb. 15: Anteile der ko-exprimierenden Zellen in der Choroidea

Choroidea



Die dargestellten vier Balkendiagramme A-D stellen die Anteile der ko-exprimierenden Zellen an allen CD20-positiven Zellen in der Choroidea graphisch dar. Die Höhe des Balkens entspricht dabei jeweils 100%, bzw. bei A = 138, bei B=91, bei C=152 und bei D=132 ausgezählten Zellen.

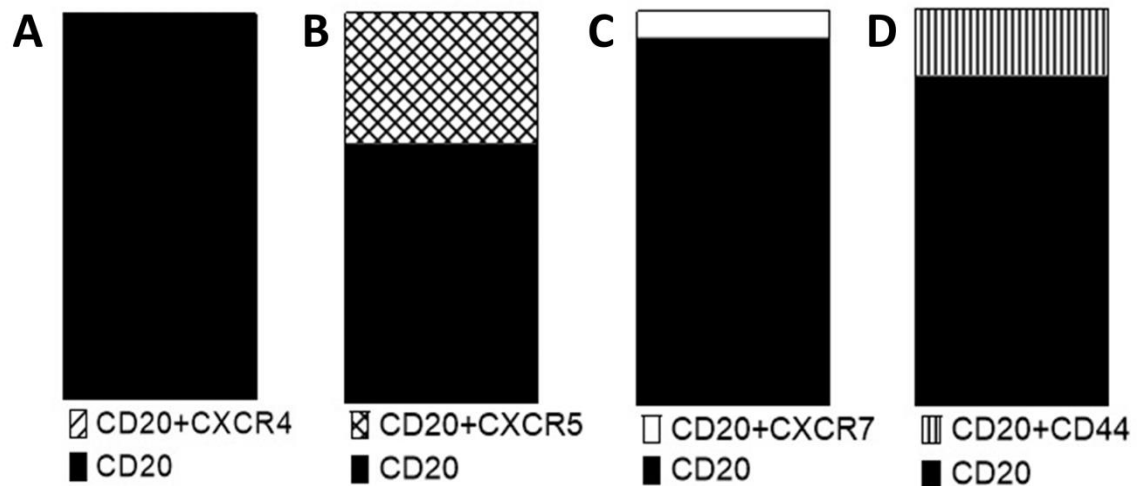
3.1.4 Anteil der ko-exprimierenden Zellen an allen CD20-positiven Zellen in der Retina

Auch bei allen Aufnahmen der Retina der PZNSL-Gruppe wurden manuell sowohl die CD20-positiven als auch die Zellen mit einer Ko-Expression der Homing-Rezeptoren ausgezählt (Abb. 16). In den Retinae der PZNSL-Gruppe zeigten 0/13 (0%) Zellen eine Ko-Expression mit CXCR4. 7/21 (ca. 33%) der CD20-positiven Zellen zeigten zusätzlich auch eine Ko-Expression mit CXCR5. CXCR7 wurde bei 2/30 (7%) CD20-positiven Zellen ko-exprimiert. Außerdem waren 3/18 (ca. 18%) der CD20-positiven Zellen zusätzlich positiv für CD44. Die Auszählung zeigt

außerdem, dass in der Retina im Vergleich zur Choroidea eine deutlich geringere Infiltration mit CD20-positiven Zellen zu beobachten war.

Abb. 16: Anteile der ko-exprimierenden Zellen in der Retina

Retina



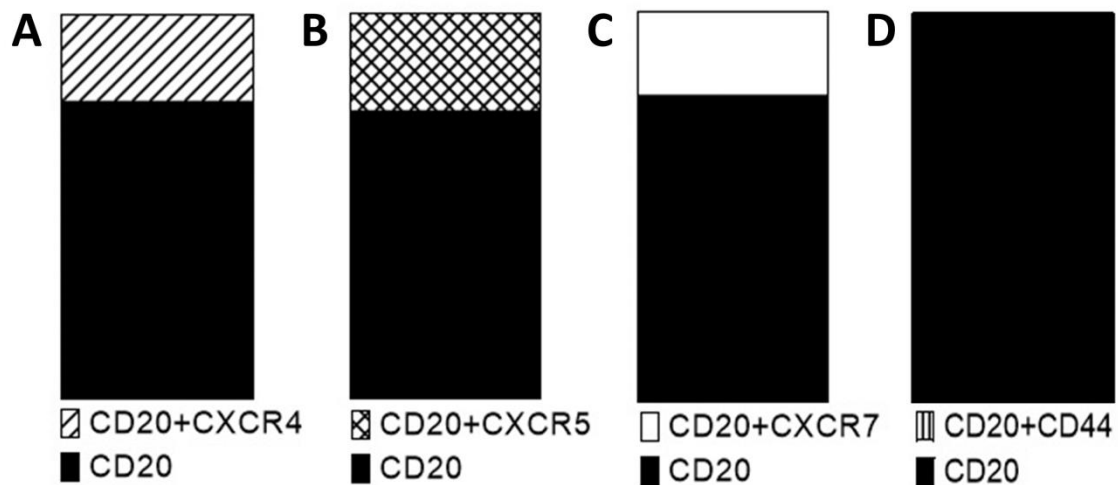
Die dargestellten vier Balkendiagramme A-D stellen die Anteile der ko-exprimierenden Zellen an allen CD20-positiven Zellen in der Retina graphisch dar. Die Höhe des Balkens entspricht dabei jeweils 100%, bzw. bei A = 13, bei B=21, bei C=30 und bei D=18 ausgezählten Zellen.

3.1.5 Anteil der ko-exprimierenden Zellen an allen CD20-positiven Zellen im Ziliarkörper

Zusätzlich wurden bei allen Aufnahmen der Ziliarkörper der PZNSL-Gruppe manuell sowohl die CD20-positiven als auch die Zellen mit einer Ko-Expression der Homing-Rezeptoren ausgezählt (Abb. 17). In den Ziliarkörpern der PZNSL-Gruppe zeigten 2/9 (ca. 22%) Zellen eine Ko-Expression mit CXCR4. 1/4 (25%) der CD20-positiven Zellen zeigten zusätzlich auch eine Ko-Expression mit CXCR5. CXCR7 wurde bei 4/19 (ca. 21%) CD20-positiven Zellen ko-exprimiert. Außerdem waren 0/5 (0%) der CD20-positiven Zellen zusätzlich positiv für CD44. Die Auszählung zeigt außerdem, dass im Ziliarkörper noch mehr als in der Retina eine deutlich geringere Infiltration mit CD20-positiven Zellen zu beobachten war.

Abb. 17: Anteile der ko-exprimierenden Zellen im Ziliarkörper

Ziliarkörper



Die dargestellten vier Balkendiagramme A-D stellen die Anteile der ko-exprimierenden Zellen an allen CD20-positiven Zellen im Ziliarkörper graphisch dar. Die Höhe des Balkens entspricht dabei jeweils 100%, bzw. bei A = 9, bei B=4, bei C=19 und bei D=5 ausgezählten Zellen.

3.2 Auswertung IRS PZNSL und SZNSL

Dass sich in der SZNSL-Gruppe keine doppelt positiven Zellen finden, wurde bereits erklärt. Dennoch exprimierten bestimmte Gewebe der SZNSL-Gruppe CXCR4, CXCR5, CXCR7 und CD44. Um zu prüfen, ob die PZNSL-Gruppe diese Rezeptoren vermehrt exprimiert, wurden beide Gruppen mit dem IRS ausgewertet und anschließend statistisch mit dem Mann-Whitney-U Test miteinander verglichen. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikanter Unterschied gewertet.

3.2.1 Untersuchung der Gleichartigkeit der Infiltration mit CD20-positiven Zellen der Choroidea der Augenpaare mit dem IRS

Mit Hilfe des erhobenen IRS kann statistisch überprüft werden, ob die Choroidea beider Augen eines Augenpaares gleichmäßig infiltriert wurden. Dazu wurden alle Färbungen der PZNSL-Gruppe mit CD20 ausgewertet und die Augenpaare in zwei Gruppen (a und b) aufgeteilt. Aus den IRS-Werten wurde sowohl für Auge a als auch Auge b (Tabelle 17) der Median berechnet. Als Teststatistik wurde der Mann-Whitney-U angewandt, ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant

angenommen und bedeutet, dass sich beide Gruppen in ihrem Infiltrationsmuster unterscheiden (Tabelle 18, Abb. 18).

Tabelle 17: Gleichartigkeit der Infiltration der Choroidea – deskriptive Statistik

	Auge a	Auge b
n	13	13
Minimum	0	0
25% Perzentile	1	2
Median	3	3
75% Perzentile	4	3
Maximum	9	9
Variationsbreite	9	9

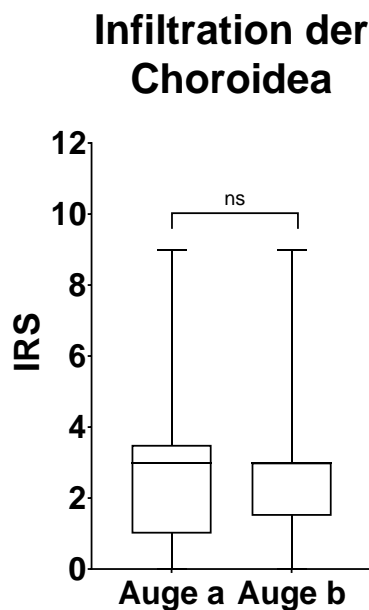
Dargestellt ist die deskriptive Statistik der Auswertung der Gleichartigkeit der Infiltration der Augen. In der obersten Zeile sind die Partneraugen a und b der PZNSL-Gruppe aufgeführt. Darunter folgen die Anzahl der Werte (n; number of values), das jeweilige Minimum, die 25%-Perzentile, der Median, die 75%-Perzentile, das Maximum und die Variationsbreite.

Tabelle 18: Gleichartigkeit der Infiltration der Choroidea – schließende Statistik

	Auge b vs. Auge a
Mann-Whitney-Test	
p-Wert	0,9251
p-Wert Zusammenfassung	ns
Signifikanter Unterschied (p<0.05)?	Nein
Rangsummen Auge a; b	173,5; 177,5
Mann-Whitney-U	82,50

Dargestellt sind die mit dem Mann-Whitney-U-Test berechneten Werte der Augen a und b. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wird als signifikant angenommen.

Abb. 18: Boxplots – Infiltration der Choroidea



Dargestellt sind Box Plots von der Auswertung der Infiltration der Choroideae. Auf der X-Achse sind die Augen a (n=13) und b (n=13) aufgelistet, auf der Y-Achse ist der immunreaktive Score (IRS) aufgetragen. Die Ränge beider Gruppen unterscheiden sich nicht. p-Werte nach Mann-Whitney-U: siehe Tabelle 18. Abkürzungen: ns = nicht signifikant

3.2.2 Choroidea

3.2.2.1 Deskriptive Statistik

Wie der nachfolgenden Tabelle 19 zu entnehmen ist, wurden in der SZNSL-Gruppe 10 und in der PZNSL-Gruppe 13 Augenpaare mit dem IRS ausgewertet. Wie bereits erklärt, fanden sich in der SZNSL-Gruppe keine CD20-positiven Zellen (IRS=0). Die Expression von CD20 in der PZNSL-Gruppe hingegen zeigt eine große Variationsbreite von IRS-Werten von 0 bis 9. Der Median des IRS von 3 zeigt, dass es sich bei CD20 in der Choroidea insgesamt um einen mäßig stark exprimierten Rezeptor handelt. Eindeutige Unterschiede zwischen den Gruppen sind bei dem Rezeptor CXCR5 zu erkennen, welcher in der SZNSL-Gruppe nicht exprimiert wurde. CXCR7 zeigt in beiden Gruppen eine schwache Expression, hinsichtlich des IRS-Medians von 2 unterscheiden sie sich nicht. Bei CXCR4 sind leichte Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen. Ähnliches ist bei CD44 zu sehen.

Tabelle 19: Deskriptive Statistik - Choroidea

	CD20		CXCR7		CXCR5		CXCR4		CD44	
	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL
n	10	13	10	13	10	13	10	13	10	13
Minimum	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
25% Perzentile	0	1	0,8	1	0	0,5	0	0	0	1
Median	0	3	2	2	0	2	0	1	0	2
75% Perzentile	0	4	2	2	0	3	0	1	0,3	3
Maximum	0	9	3	3	0	4	1	3	1	4
Variationsbreite	0	9	3	2	0	4	1	3	1	3

Dargestellt ist die deskriptive Statistik der Auswertung der Choroidea. In der obersten Zeile sind alle Färbungen für jeweils die SZNSL-Gruppe und die PZNSL-Gruppe aufgeführt. Darunter folgen die Anzahl der Werte (*n*; number of values), das jeweilige Minimum, die 25%-Perzentile, der Median, die 75%-Perzentile, das Maximum und die Variationsbreite.

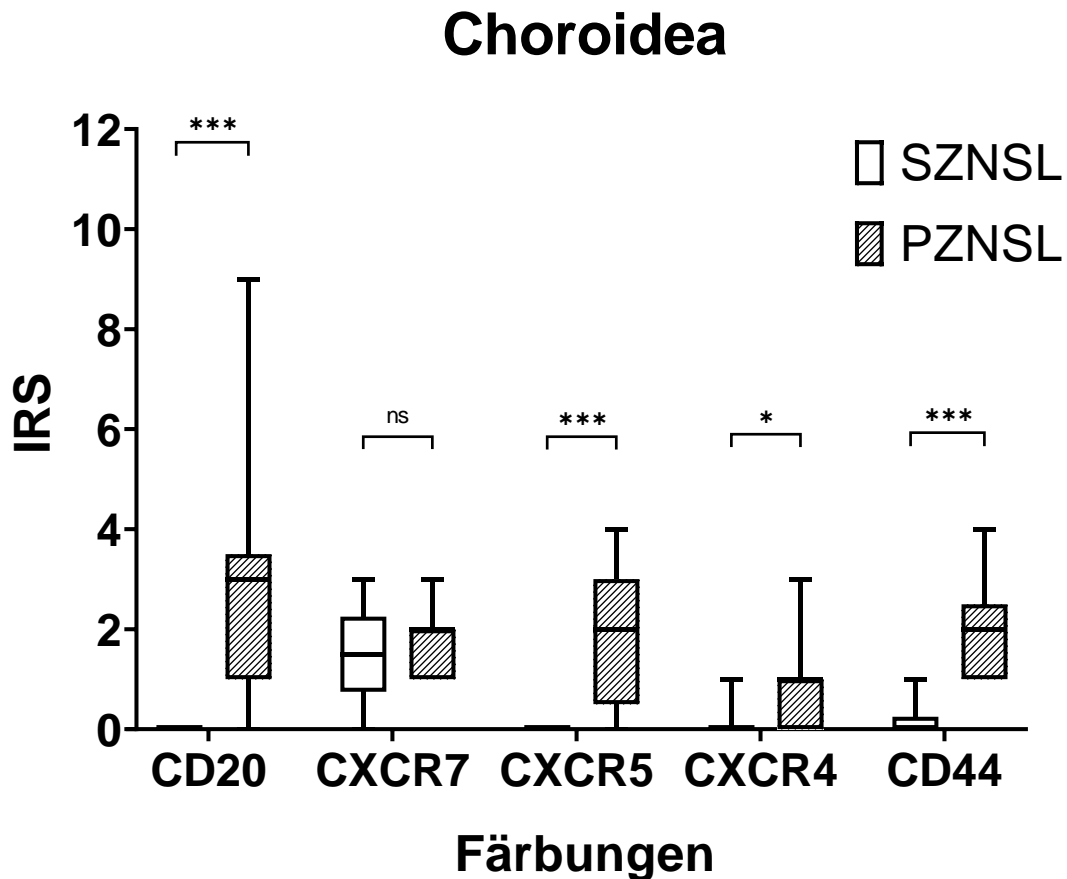
3.2.2.2 Schließende Statistik

Mit dem Mann-Whitney-U Test wurden die Ränge der SZNSL-Gruppe mit der PZNSL-Gruppe auf ihre statistischen signifikanten Unterschiede hin überprüft. Die Ergebnisse können der nachfolgenden Tabelle 20 und der Abb. 19 entnommen werden. Alle Rezeptoren außer CXCR7 der beiden Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Expressionsstärke in der Choroidea signifikant. Deutliche Unterschiede waren bei den Rezeptoren CD20, CXCR5 und CD44 zu sehen.

Tabelle 20: Schließende Statistik - Choroidea

PZNSL vs. SZNSL	CD20 PZNSL vs. CD20 SZNSL	CXCR7 PZNSL vs. CXCR7 SZNSL	CXCR5 PZNSL vs. CXCR5 SZNSL	CXCR4 PZNSL vs. CXCR4 SZNSL	CD44 PZNSL vs. CD44 SZNSL
Mann-Whitney-Test					
p-Wert (exakt, zweiseitig)	<0,0001	0,7408	0,0004	0,0205	<0,0001
p-Wert Zusammenfassung	****	ns	***	*	****
Signifikanter Unterschied?	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja
Rangsummen SZNSL; PZNSL	65; 211	113,5; 162,5	70; 206	85,5; 190,5	59; 217
Mann-Whitney-U	10	58.5	15	30.5	4

Dargestellt sind die mit dem Mann-Whitney-U-Test berechneten Werte der Choroidea. In der obersten Zeile sind die Färbungen der Gruppen SZNSL und PZNSL dargestellt, welche miteinander verglichen werden. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wird als signifikant angenommen.



Dargestellt sind Box Plots von der Auswertung der Choroideae. Auf der X-Achse sind die Färbungen aufgelistet, auf der Y-Achse ist der immunreaktive Score (IRS) aufgetragen. Box Plots der Gruppe des SZNSL (n=10) sind weiß, die der Gruppe des PZNSL (n=13) sind schwarz-gestreift. Die Ränke beider Gruppen unterscheiden sich bei allen Färbungen signifikant außer bei der Färbung von CXCR7(100). p-Werte nach Mann-Whitney-U: siehe Tabelle 20.

Abkürzungen: ns = nicht signifikant; *** = $p < 0,001$; * = $p < 0,05$

3.2.3 Retina

3.2.3.1 Deskriptive Statistik

Die nachfolgende Tabelle 21 zeigt die Auswertung der Retina beider Gruppen mit dem IRS. Insgesamt ist an den IRS-Werten vom Rezeptor CD20 zu erkennen, dass es kaum CD20-positive Zellen in der Retina gab, und dass diese schwach positiv sind. Die Rezeptoren CXCR5 und CD44 zeigten ebenfalls ein schwaches Expressionsmuster sowohl in der SZNSL- als auch in der PZNSL-Gruppe. Der Rezeptor CXCR7 zeigt in beiden Gruppen eine schwach bis mäßige Expression. CXCR4 war mehr in der SZNSL-Gruppe als in der PZNSL-Gruppe in der Retina mäßig stark exprimiert.

Tabelle 21: Deskriptive Statistik - Retina

	CD20		CXCR7		CXCR5		CXCR4		CD44	
	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL
n	10	13	10	13	10	13	10	13	9	13
Minimum	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
25% Perzentile	0	0	1	2	0	0	0,8	0	0	0
Median	0	1	3	2	0	1	3	0	0	1
75% Perzentile	0	1	4	4	1	2	5	0	0	2
Maximum	0	1	5	6	1	2	5	1	2	2
Variationsbreite	0	1	4	6	1	2	5	1	2	2

Dargestellt ist die deskriptive Statistik der Auswertung der Retina. In der obersten Zeile sind alle Färbungen für jeweils die SZNSL-Gruppe und die PZNSL-Gruppe aufgeführt. Darunter folgen die Anzahl der Werte (n; number of values), das jeweilige Minimum, die 25%-Perzentile, der Median, die 75%-Perzentile, das Maximum und die Variationsbreite.

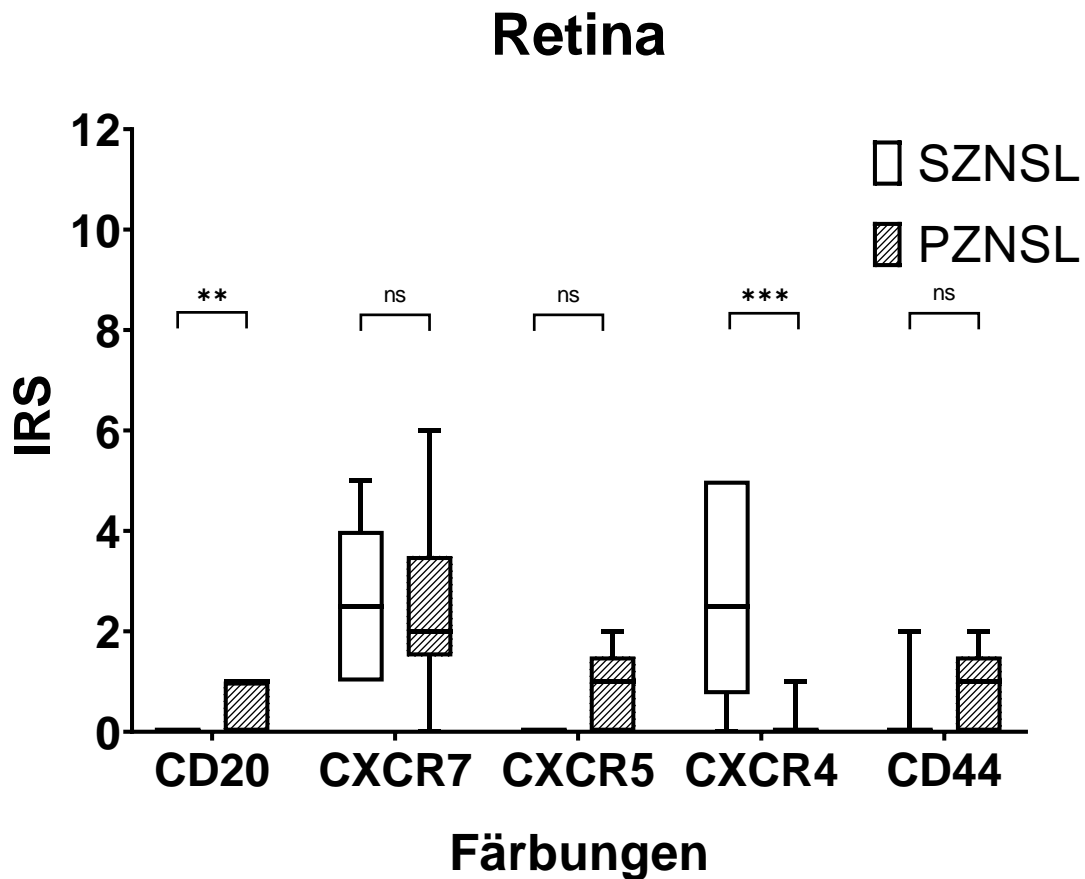
3.2.3.2 Schließende Statistik

Mit dem Mann-Whitney-U Test wurden die Ränge der SZNSL-Gruppe mit der PZNSL-Gruppe auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Die Ergebnisse können der nachfolgenden Tabelle 22 und Abb. 20 entnommen werden. Es unterscheiden sich die Expression der Rezeptoren CD20 und CXCR4 in der Retina signifikant. CD20 war in der PZNSL-Gruppe signifikant höher exprimiert als in der SZNSL-Gruppe. CXCR4 wurde in der SZNSL-Gruppe signifikant höher exprimiert als in der PZNSL-Gruppe. Die übrigen Rezeptoren CXCR7, CXCR5 und CD44 zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

Tabelle 22: Schließende Statistik - Retina

PZNSL vs. SZNSL	CD20 PZNSL vs. CD20 SZNSL	CXCR7 PZNSL vs. CXCR7 SZNSL	CXCR5 PZNSL vs. CXCR5 SZNSL	CXCR4 PZNSL vs. CXCR4 SZNSL	CD44 PZNSL vs. CD44 SZNSL
Mann-Whitney-Test					
p-Wert (exakt, zweiseitig)	0,0075	0,9706	0,1193	0,0008	0,0594
p-Wert Zusammenfassung	**	ns	ns	***	ns
Signifikanter Unterschied?	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein
Rangsummen SZNSL; PZNSL	85; 191	121; 155	95; 181	168; 108	76.5; 176.5
Mann-Whitney-U	30	64	40	17	31.5

Dargestellt sind die mit dem Mann-Whitney-U-Test berechneten Werte der Retina. In der obersten Zeile sind die Färbungen der Gruppen SZNSL und PZNSL dargestellt, welche miteinander verglichen werden. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wird als signifikant angenommen.



Dargestellt sind Box Plots von der Auswertung der Retinae. Auf der X-Achse sind die Färbungen aufgelistet, auf der Y-Achse ist der immunreaktive Score (IRS) aufgetragen. Box Plots der Gruppe des SZNSL (n=10) sind weiß, die der Gruppe des PZNSL (n=13) sind schwarz-gestreift. Die Ränke beider Gruppen unterscheiden sich nur bei den Färbungen CD20 und CXCR4 signifikant(100). p-Werte nach Mann-Whitney-U: siehe Tabelle 22.

Abkürzungen: ns = nicht signifikant; *** = $p < 0,001$; ** = $p < 0,01$

3.2.4 Ziliarkörper

3.2.4.1 Deskriptive Statistik

Die nachfolgende Tabelle 23 zeigt die Auswertung des Ziliarkörpers beider Gruppen mit dem IRS. Insgesamt ist an den IRS-Werten vom Rezeptor CD20 zu erkennen, dass es kaum CD20-positive Zellen im Ziliarkörper gab. Der Rezeptor CXCR5 zeigte ebenfalls ein schwaches Expressionsmuster in der PZNSL-Gruppe. Der Rezeptor CXCR7 zeigt in beiden Gruppen eine schwach bis mäßige Expression. CXCR4 war mehr in der SZNSL-Gruppe als in der PZNSL-Gruppe in der Retina mäßig stark exprimiert. CD44 wurde in beiden Gruppen ähnlich stark exprimiert.

Tabelle 23: Deskriptive Statistik: Ziliarkörper

	CD20		CXCR7		CXCR5		CXCR4		CD44	
	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL
n	10	13	10	13	10	13	10	13	9	13
Minimum	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0
25% Perzentile	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0
Median	0	0	4	4	0	1	0	0	1	2
75% Perzentile	0	1	5	4	0	1	0	2	2	2
Maximum	0	1	5	6	0	2	7	2	3	2
Variationsbreite	0	1	3	4	0	2	7	2	3	2

Dargestellt ist die deskriptive Statistik der Auswertung des Ziliarkörpers. In der obersten Zeile sind alle Färbungen für jeweils die SZNSL-Gruppe und die PZNSL-Gruppe aufgeführt. Darunter folgen die Anzahl der Werte (n; number of values), das jeweilige Minimum, die 25%-Perzentile, der Median, die 75%-Perzentile, das Maximum und die Variationsbreite.

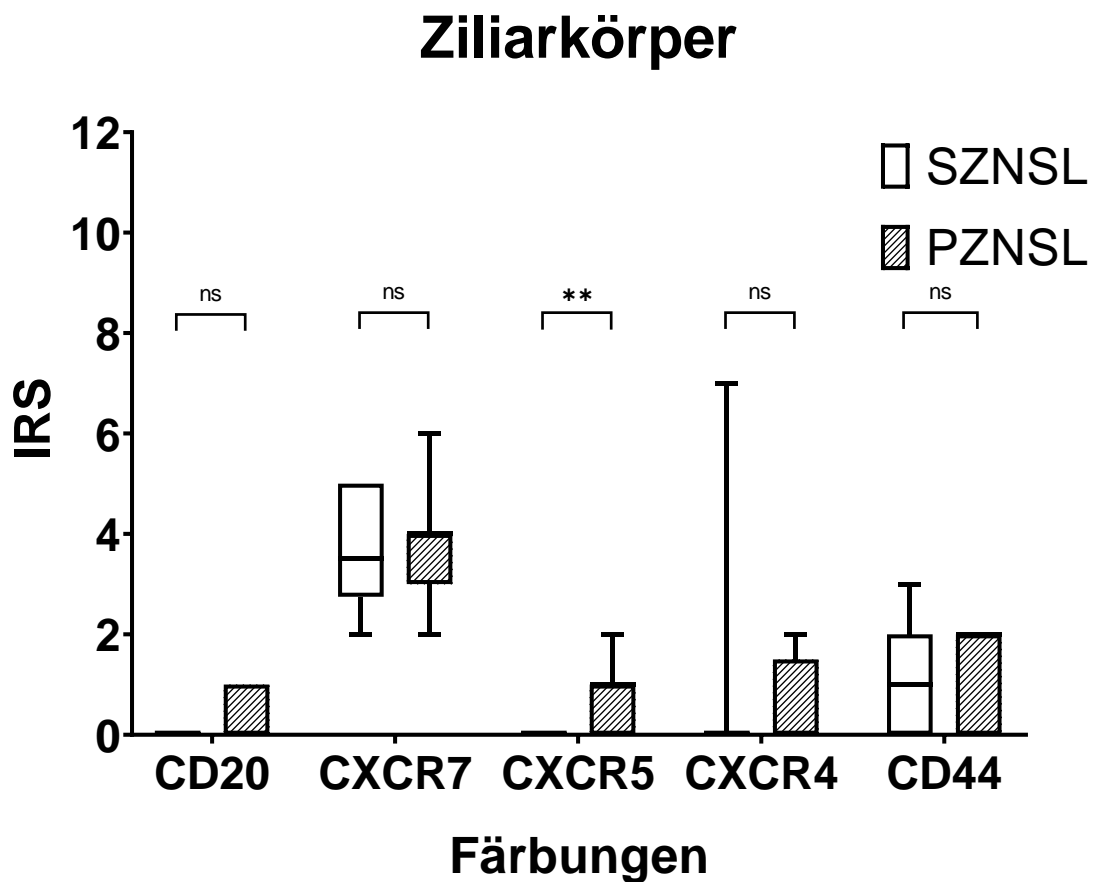
3.2.4.2 Schließende Statistik

Mit dem Mann-Whitney-U Test wurden die Ränge der SZNSL-Gruppe mit der PZNSL-Gruppe auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Die Ergebnisse können der nachfolgenden Tabelle 24 und der Abb. 21 entnommen werden. Es unterscheidet sich hier lediglich die Expression des Rezeptors CXCR5 in dem Ziliarkörper signifikant. CXCR5 wurde in der PZNSL-Gruppe signifikant höher exprimiert als in der SZNSL-Gruppe. Die übrigen Rezeptoren CD20, CXCR4, CXCR7 und CD44 zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

Tabelle 24: Schließende Statistik – Ziliarkörper

PZNSL vs. SZNSL	CD20 PZNSL vs. CD20 SZNSL	CXCR7 PZNSL vs. CXCR7 SZNSL	CXCR5 PZNSL vs. CXCR5 SZNSL	CXCR4 PZNSL vs. CXCR4 SZNSL	CD44 PZNSL vs. CD44 SZNSL
Mann-Whitney-Test					
p-Wert (exakt, zweiseitig)	0,1045	0,9355	0,0075	0,1573	0,6809
p-Wert Zusammenfassung	ns	ns	**	ns	ns
Signifikanter Unterschied?	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein
Rangsummen SZNSL; PZNSL	100; 176	121,5; 154,5	85; 191	99,5; 176,5	98; 155
Mann-Whitney-U	45	63,5	30	44,5	53

Dargestellt sind die mit dem Mann-Whitney-U-Test berechneten Werte des Ziliarkörpers. In der obersten Zeile sind die Färbungen der Gruppen SZNSL und PZNSL dargestellt, welche miteinander verglichen werden. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wird als signifikant angenommen.



Dargestellt sind Box Plots von der Auswertung der Ziliarkörper. Auf der X-Achse sind die Färbungen aufgelistet, auf der Y-Achse ist der immunreaktive Score (IRS) aufgetragen. Box Plots der Gruppe des SZNSL (n=10) sind weiß, die der Gruppe des PZNSL (n=13) sind schwarz-gestreift. Die Ränke beider Gruppen unterscheiden sich bei allen Färbungen nicht, außer bei der Färbung von CXCR5(100). p-Werte nach Mann-Whitney-U: siehe Tabelle 24.

Abkürzungen: ns = nicht signifikant; ** = $p < 0,01$

3.2.5 Sehnerv

3.2.5.1 Deskriptive Statistik

Die nachfolgende Tabelle 25 zeigt die Auswertung der Sehnerven beider Gruppen mit dem IRS. Insgesamt ist an den IRS-Werten vom Rezeptor CD20 zu erkennen, dass es kaum CD20-positive Zellen in den Sehnerven gab, und dass diese schwach positiv sind. Die Rezeptoren CXCR4, CXCR5 und CXCR7 zeigten ebenfalls ein schwaches Expressionsmuster sowohl in der SZNSL- als auch in der PZNSL-Gruppe. CD44 war im Sehnerv nicht exprimiert.

Tabelle 25: Deskriptive Statistik - Sehnerv

	CD20		CXCR7		CXCR5		CXCR4		CD44	
	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL	SZNSL	PZNSL
n	3	8	3	8	3	7	3	8	3	8
Minimum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25% Perzentile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Median	0	0,5	1	0	0	0	1	0	0	0
75% Perzentile	1	1	1	0	0	2	2	0	0	0
Maximum	1	2	1	1	0	3	2	2	0	0
Variationsbreite	1	2	1	1	0	3	2	2	0	0

Dargestellt ist die deskriptive Statistik der Auswertung des Sehnervs. In der obersten Zeile sind alle Färbungen für jeweils die SZNSL-Gruppe und die PZNSL-Gruppe aufgeführt. Darunter folgen die Anzahl der Werte (n; number of values), das jeweilige Minimum, die 25%-Perzentile, der Median, die 75%-Perzentile, das Maximum und die Variationsbreite.

3.2.5.2 Schließende Statistik

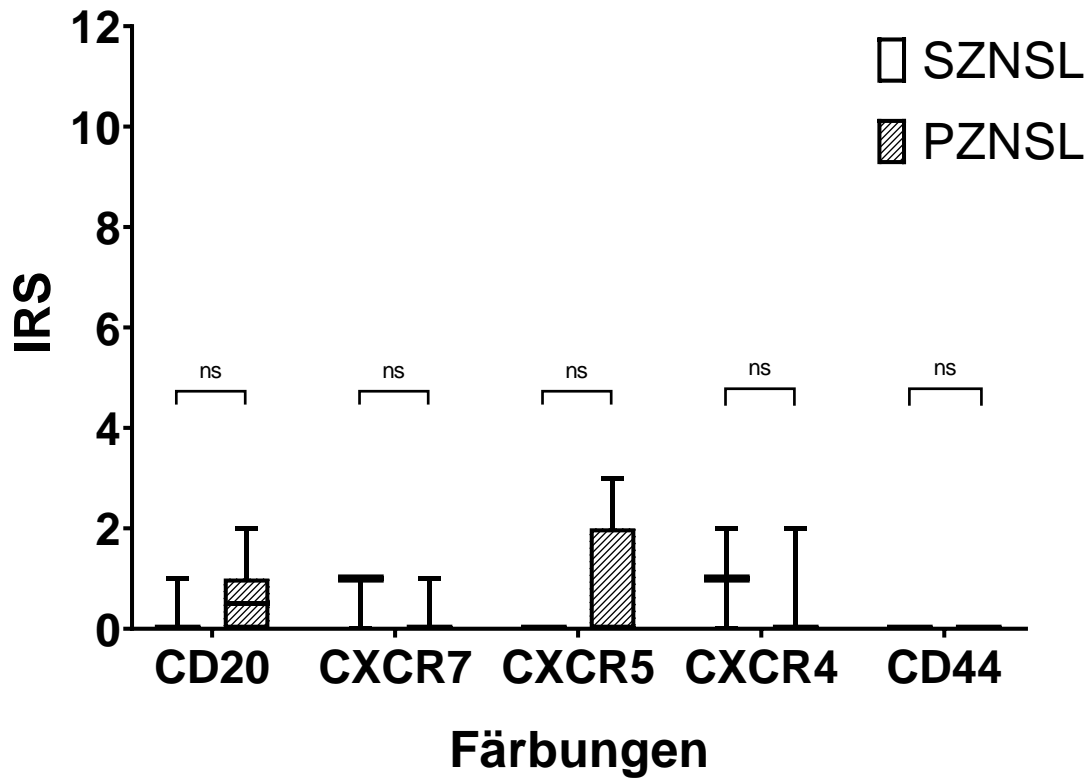
Mit dem Mann-Whitney-U Test wurden die Ränge der SZNSL-Gruppe mit der PZNSL-Gruppe auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Die Ergebnisse können der nachfolgenden Tabelle 26 und der Abb. 22 entnommen werden. Keiner der fünf untersuchten Rezeptoren CD20, CXCR4, CXCR5, CXCR7 und CD44 wird in der PZNSL-Gruppe signifikant stärker exprimiert. Es lässt sich aber bei CXCR5 eine Tendenz erkennen, dass dieser Rezeptor in der PZNSL vermehrt exprimiert wurde.

Tabelle 26: Schließende Statistik - Sehnerv

PZNSL vs. SZNSL	CD20 PZNSL vs. CD20 SZNSL	CXCR7 PZNSL vs. CXCR7 SZNSL	CXCR5 PZNSL vs. CXCR5 SZNSL	CXCR4 PZNSL vs. CXCR4 SZNSL	CD44 PZNSL vs. CD44 SZNSL
Mann-Whitney-Test					
p-Wert (exakt, zweiseitig)	0,9091	0,1515	0,4750	0,1515	>0,9999
p-Wert Zusammenfassung	ns	ns	ns	ns	ns
Signifikanter Unterschied?	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Rangsummen SZNSL; PZNSL	15.50; 50.50	24.50; 41.50	12; 43	24; 42	18; 48
Mann-Whitney-U	9.500	5.500	6	6	12

Dargestellt sind die mit dem Mann-Whitney-U-Test berechneten Werte des Sehnervs. In der obersten Zeile sind die Färbungen der Gruppen SZNSL und PZNSL dargestellt, welche miteinander verglichen werden. Ein p-Wert von $p < 0,05$ wird als signifikant angenommen.

Sehnerv



Dargestellt sind Box Plots von der Auswertung der Sehnerven. Auf der X-Achse sind die Färbungen aufgelistet, auf der Y-Achse ist der immunreaktive Score (IRS) aufgetragen. Box Plots der Gruppe des SZNSL ($n=3$) sind weiß, die der Gruppe des PZNSL ($n=8$) sind schwarz-gestreift. Die Ränge beider Gruppen unterscheiden sich bei allen Färbungen nicht signifikant. p -Werte nach Mann-Whitney-U: siehe Tabelle 26.

Abkürzungen: ns = nicht signifikant

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob in einem PDX-PZNSL Mausmodell im Vergleich zur Kontrollgruppe eines PDX-SZNSL Mausmodell eine PVRL-Situation hergestellt werden kann. Dazu wurden 13 Augenpaare der PZNSL-Gruppe und 10 Augenpaare der SZNSL-Gruppe auf eine Infiltration mit CD20-positiven B-Lymphomzellen untersucht. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Lymphomzellen zu CD20 auch einen Homingrezeptor (CXCR4, CXCR5, CXCR7 oder CD44) ko-exprimieren. Es wurden dazu Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen angefertigt.

Die Auswertung der Augen unter dem Immunfluoreszenzmikroskop ergab, dass 11/13 Augenpaare der PZNSL-Gruppe mit CD20-positiven Lymphomzellen infiltriert waren. In der SZNSL-Gruppe fand sich keine Infiltration. In der PZNSL-Gruppe waren die Lymphomzellen, welche zusätzlich CXCR4, CXCR5 und CD44 exprimierten, vor allem in der Choroidea lokalisiert. Vereinzelt ließen sich auch ko-exprimierende Zellen in der Retina und im Ziliarkörper nachweisen. Dies lässt sich auch mit Hilfe der angegebenen Anteile der ko-exprimierenden Zellen an allen CD20-positiven-Zellen nachvollziehen. Auch im Sehnerv der PZNSL-Gruppe fanden sich CD20-positive Zellen. Die Auswertung mit dem IRS ergab, dass die Rezeptoren CXCR4, CXCR5 und CD44 v.a. in der Choroidea der PZNSL-Gruppe signifikant höher als in der SZNSL-Gruppe exprimiert wurden.

4.2 Vergleich mit anderen Mausmodellen für das PVRL

4.2.1 Infiltration mit CD20-positiven Lymphomzellen

In allen unter 1.3.3. erwähnten PVRL-Mausmodellen konnte eine intraokuläre Infiltration mit Lymphomzellen nachgewiesen werden. Assaf et al. (1997), Hochman et al. (2001) und Chan et al. (2005) nutzen für ihre Modelle murine T-Lymphomzellen, welche entweder intraperitoneal (Assaf, Hochman) oder intravitreal (Chan) BALB/c-Mäusen injiziert wurden. Bei Assaf und Hochman infiltrierten die T-Lymphozyten viele intraokuläre Strukturen. Vor allem die Choroidea zeigte eine starke Infiltration, aber auch in der Tränendrüse, dem

Sehnerv, dem Ziliarkörper, der Iris und der vorderen Augenkammer ließen sich Lymphomzellen nachweisen. Assaf et al. beschreiben zusätzlich subretinale Infiltrationen sowie eine Infiltration der Lider, der Konjunktiva der äußeren Augenmuskeln(56,64). Bei Chan et al. fanden sich T-Lymphomzellen im Glaskörper, subretinal und in der vorderen Augenkammer(65). Diese Ergebnisse lassen sich nur sehr eingeschränkt mit unseren Ergebnissen vergleichen, da sich T-Zell-Lymphome stark von B-Zell-Lymphomen unterscheiden. Vermutlich gelangen maligne T-Zellen eher über Hirnnerven in das Gehirn und über den N. opticus in das Auge. Zudem treten die sehr seltenen und ungewöhnlichen intraokulären T-Zell-Lymphome im Rahmen von systemischen Lymphomen und kaum primär auf(101). Daher muss bei okulären T-Zell-Lymphomen von einer generalisierten Disseminierung ausgegangen werden, die nicht nur spezifisch das Auge betrifft, wie es bei PVRL der Fall ist.

Touitou et al. (2007) und Ben Abdelwahed et al. (2013) arbeiteten mit BALBc-Mäusen, denen murine B-Lymphomzellen intravitreal injiziert wurden. Bei beiden Modellen waren Glaskörper und die Retina mit B-Lymphomzellen infiltriert. Touitou et al. beschreiben zusätzlich, dass auch die vordere Augenkammer, die Iris, der Ziliarkörper und die Choroidea infiltriert waren(69,71).

Li et al. (2006) und Mineo et al. (2008) entwickelten beide Xenograft-Mausmodelle, in denen SCID-Mäusen (Li) bzw. C3H/HeN-Mäusen (Mineo) humane B-Lymphomzellen intravitreal injiziert wurden. Beide Arbeitsgruppen konnten in ihren Modellen eine Infiltration des Glaskörpers und der Retina nachweisen. Bei Li et al. zeigten sich zusätzlich auch B-Lymphomzellen um den Sehnerv herum und im Gehirn. Mineo konnten zeigen, dass die B-Lymphomzellen nach längerer Zeit nach der Retina auch den subretinalen Raum, die vordere Augenkammer und die Konjunktiva infiltrierten(68,70).

Bei der Untersuchung der Augen unseres Modells konnten wir ähnliche Ergebnisse finden. Hier fanden sich CD20-positive Lymphomzellen vor allem in der Choroidea, aber auch die Retina und der Ziliarkörper waren infiltriert (Abb. 11, Abb. 12, Abb. 13, Abb. 14). Ob einzelne Lymphomzellen unter dem RPE und somit nicht choroidal lokalisiert waren, lässt sich auf Grund der schlechten Darstellbarkeit der

Bruchmembran mit Hilfe der Immunfluoreszenz nur schlecht beurteilen. Im Sehnerv fanden sich vereinzelt B-Lymphomzellen (Abb. 24). Auch in der Glandula lacrimalis konnten wir B-Lymphomzellen nachweisen. Interessanterweise fanden wir im Glaskörper keine Infiltration, genauso wenig in der vorderen Augenkammer, der Iris oder der Konjunktiva.

Diese leichten Unterschiede resultieren möglicherweise aus der anderen Methodik, die für das in dieser Arbeit verwendete Mausmodell von Isbell et al (2022) genutzt wurde. Im Unterschied zu anderen Mausmodellen für das PVRL(65,68–71), bei denen die Lymphomzellen direkt intravitreal injiziert wurden, wurden bei dem Modell von Isbell et al. humane DLBCL-Xenograft-Lymphomzellen von SZNSL oder PZNSL den Mäusen intrasplenisch injiziert(72). Dadurch handelt es sich hier um ein Homing-Modell, da die Lymphomzellen von diesem Organ in das ZNS und in die Augen gelangen. Auch die Modelle von Assaf et al. und Hochman et al. können als Homing-Modelle bezeichnet werden, da die Lymphomzellen intraperitoneal gespritzt wurden. Allerdings handelt es sich hier um T-Zell-Modelle, welche sich auf Grund der deutlich unterschiedlichen Pathogenese von T-Zell-Lymphomen nicht mit B-Zell-Lymphomen und B-Zell-Modellen vergleichen lassen.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass ein großer Teil der Augenpaare des PZNSL-Modells jedoch keine der Augenpaare des SZNSL-Modells mit CD20-positiven Lymphomzellen infiltriert waren. Daraus können wir folgern, dass das genutzte Modell zur Untersuchung des B-Lymphomzell-Homings geeignet ist. Weiterhin konnten die Ergebnisse von Isbell et al., welche das Modell etablierten, weitestgehend bestätigt werden(72). Zudem lässt sich aus den Ergebnissen ableiten, dass PZNSL und somit auch PVRL durch Homing von B-Lymphomzellen entstehen können, wodurch sie sich in ihrer Pathogenese deutlich von den SZNSL unterscheiden, welche keine Infiltration des Auges zeigten.

4.3 Ko-Expression von CD20 und Homing-Rezeptoren

Auf Grund der geringen Datenlage zu Chemokinen und Homing-Rezeptoren beim PVRL werden die Ergebnisse sowohl mit Mausmodellen zu DLBCL, PZNSL und primären testikulären Lymphomen (PTL) als auch mit Untersuchungen an DLBCL-Patientenproben verglichen. Die drei primären Lymphome PVRL, PZNSL und PTL

lassen sich dabei gut vergleichen, da alle größtenteils vom DLBCL-Typ sind und alle in immunprivilegierten Organen (Auge, Gehirn, Hoden) primär entstehen(4–6,26,102,103). In diesen immunprivilegierten Organen mit vulnerablen Geweben ist die physiologische Immunantwort und die Fähigkeit zur Antigenerkennung unterdrückt(104). Somit kann für diese drei primären Lymphome eine ähnliche Pathogenese angenommen werden.

4.3.1 Ko-Expression von CD20 und CXCR4

CXCR4 wird bei vielen Krebs-Entitäten, wie z.B. der Nieren, der Lunge, der Brust und vielen weiteren Organen, vermehrt exprimiert und gilt bei diesen häufig als prognostisch ungünstiger Faktor. Zudem ist CXCR4 mit einer beschleunigten Metastasierung und der Entwicklung von Therapieresistenzen bei z.B. Brustkrebs assoziiert(105–112). Bei DLBCL, welche am häufigsten bei PVRL, PZNSL und PTL diagnostiziert werden, kann CXCR4 zum einen die Proliferation der Tumormasse erhöhen und das Überleben dieser sichern(113). Daher wird vermutet, dass CXCR4 und sein Ligand CXCL12 mit ursächlich für die Pathogenese dieser extranodalen primären B-Zell-Lymphome sind.

Es gibt nur wenige Studien, die CXCR4 und CXCL12 bei PVRL, PZNSL und PTL untersucht haben. Das bereits beschriebene Xenograft-Mausmodell von Li et al. (2006) ist zwar kein Homing-Modell, aber es ist das einzige Modell für PVRL, welches Chemokine untersuchte. Hier konnte mittels Flow-Zytometrie und real-time PCR nachgewiesen werden, dass die intravitreal gespritzten humanen Lymphomzellen CXCR4 und auch CXCR5 exprimierten(68).

Chan et al. (2003, 2004), welche PVRL-Zellen, und Lemma et al. (2016), welche PZNSL-Zellen untersuchten, konnten eine Expression von CXCR4 auf Lymphomzellen in den Patientenproben nachweisen. Auch wurde eine Expression von CXCL12, dem Liganden von CXCR4, in der Retina, vom retinalen Pigmentepithel und von zerebralen Gefäßendothelien gefunden(38,114,115).

Brunn et al. (2007) untersuchten die Expression von CXCR4, CXCR5, CXCL12 und CXCL13 in Patientenproben von PZNSL-Patienten mittels Reverse-Transkriptase-PCR und Immunhistochemie. Die Lymphomzellen exprimierten sowohl CXCR4 als auch CXCL12. CXCL12 wurde zusätzlich von Gefäßendothelien und aktivierten

Mikrogliazellen exprimiert(102). Auch Smith et al. (2007) untersuchten PZNSL-Patienten-Biopsien mit immunhistochemischen Färbungen und konnten ebenfalls eine CXCR4-Expression von malignen B-PZNSL-Zellen nachweisen(116).

Ähnliche CXCR4-Expressionsmuster finden sich auch in primären testikulären Lymphomen (PTL), welche PZNSL- und somit auch PVRL durch ihre immunprivilegierte Nische stark ähneln(6). Menter et al. charakterisierten den Phänotyp von humanen PTL vom DLBCL-Typ und untersuchten daher u.a. CXCR4, welches bei rund der Hälfte der Tumoren exprimiert wurde(117). Auch Ollikainen et al. (2021) untersuchten PTL (DLBCL) und systemische DLBCL aus Patientenproben und konnten ebenfalls eine vermehrte Expression von CXCR4 bei PTL feststellen. Außerdem war CXCR4 mit einer schlechteren Prognose assoziiert(118).

In unserer Arbeit konnte eine Ko-Expression von CD20 und CXCR4 auf Lymphomzellen in der PZNSL-Gruppe nachgewiesen werden. In der Choroidea betrug der Anteil der ko-exprimierenden Zellen an allen CD20-positiven Zellen ca. 15%. Zudem war der Rezeptor CXCR4 in der PZNSL-Gruppe in der Choroidea signifikant höher exprimiert als in der SZNSL-Gruppe. So können die Hypothesen, CD20 und CXCR4 werden bei Mäusen mit einem primären B-Zell-Lymphombefall ko-exprimiert und CXCR4 wird im Allgemeinen bei Mäusen mit einem primären B-Zell-Lymphombefall höher exprimiert als bei Mäusen mit einem sekundären B-Zell-Lymphombefall, zumindest für die Choroidea bestätigt werden. Unsere Ergebnisse bestätigen somit die Erkenntnisse der anderen Arbeiten.

Entgegen den Erwartungen wurde CXCR4 in der Retina in der SZNSL-Gruppe signifikant höher exprimiert. Dies legt nahe, dass CXCR4 in der Retina von anderen Zellen exprimiert wird, da sich keine CD20/CXCR4-positiven Lymphomzellen in der Retina fanden. Bhutto et al. (2006) untersuchten in ihrer Arbeit u.a. humane gesunde Retinae. Dort wurde CXCR4 ebenfalls in der Retina von Photorezeptorzellen, Endothelzellen und dem retinalen Pigmentepithel (RPE) exprimiert(77). Da sich aber in der Retina der PZNSL-Gruppe kaum CXCR4-positive Zellen fanden, gehen wir von einer unspezifischen Färbung in der SZNSL-Retina aus.

Es lässt sich somit festhalten, dass CXCR4 von CD20-positiven Lymphomzellen in PVRL bzw. PZNSL exprimiert wird. Ob CXCR4 tatsächlich das Homing von B-Lymphomzellen allein vermittelt oder eventuell Ko-Faktoren benötigt, lässt sich anhand dieser Ergebnisse nicht sagen. Trotzdem bleibt CXCR4 weiterhin für die These des Homings interessant, v.a. da sein Ligand CXCL12 im Auge exprimiert werden kann und die Chemotaxis von CD20/CXCR4-positiven Lymphomzellen vermitteln könnte(38,114).

4.3.2 Ko-Expression von CD20 und CXCR5

CXCR5 und sein Ligand CXCL13 sind eher B-Zell spezifisch und daher besonders interessant für das Homing von B-Lymphomzellen(78). CXCR5 und CXCL13 spielen ähnlich wie CXCR4 und CXCL12 eine Rolle im Tumorwachstum, -überleben, -invasion und Metastasierung sowohl bei hämatologischen Neoplasien als auch bei soliden Tumoren. Bei Letzteren ist eine erhöhte Expression von CXCR5 und CXCL13 mit einem schlechteren Outcome assoziiert(87,119–125).

Die bereits beschriebene Arbeit von Li et al. (2006) beschrieb eine Expression von CXCR4 und CXCR5 in einem Xenograft-PVRL-Mausmodell. Im Gegensatz zu CXCR4 konnten für CXCR5 zudem eine Hochregulation in vivo (Mausmodell) im Gegensatz zu Untersuchungen in vitro (Zellkultur) gezeigt werden, obwohl in beiden Fällen die gleiche Zelllinie untersucht wurde(68).

Auch Chan et al. (2003, 2004) untersuchten nicht nur CXCR4, sondern auch CXCR5 in PVRL. Dabei wurde CXCR5 exklusiv von Lymphomzellen exprimiert. Ähnlich wie CXCL12 wurde auch CXCL13 vom RPE exprimiert(38,114).

Die ebenfalls vorbeschriebene Arbeit von Lemma et al. (2016) fand in PZNSL-Proben zusätzlich zur Expression von CXCR4 auch eine Expression von CXCR5 auf den Lymphomzellen, welche mit der ZNS-Infiltration stark korrelierte(115). Brunn et al. (2007) konnten auch eine starke Expression von CXCR5 in PZNSL nachweisen. Zusätzlich zeigte sich eine Expression von CXCL13 in Endothelzellen, was die Homing-Hypothese weiter unterstützt(102). Letzteres zeigt auch die Arbeit von Smith et al. (2003)(83).

Ollikainen et al. (2021) hat, wie bereits beschrieben, humane PTL vom DLBCL-Typ untersucht. Zusätzlich zu CXCR4 war dort auch CXCR5 exprimiert, allerdings in geringerem Maße als CXCR4. Auch CXCL13 wurde von den Lymphomzellen exprimiert(118).

Die Auswertung unserer Ergebnisse zeigt, dass CXCR5 auf CD20-positiven Lymphomzellen ko-exprimiert wird. Der Anteil der ko-exprimierenden Zellen an allen CD20-positiven Zellen ist in der Choroidea mit 35% und in der Retina mit 33% in etwa gleich groß. Im Ziliarkörper zeigten 25% der Lymphomzellen eine Ko-Expression mit CXCR5. Damit ist CXCR5 auch der Rezeptor, der von allen untersuchten Rezeptoren am häufigsten zusätzlich exprimiert wurde. Dies wird durch die Ergebnisse der Auswertung mit dem IRS bestätigt. CXCR5 wird in der Choroidea und dem Ziliarkörper signifikant höher exprimiert. In der Retina wurde CXCR5 ebenfalls höher exprimiert, allerdings war das Ergebnis nicht signifikant. Es lässt sich aber eine deutliche Tendenz erkennen. Hervorzuheben ist außerdem, dass die IRS-Werte von CXCR5 in der Choroidea, der Retina, dem Ziliarkörper und dem Sehnerv der SZNSL-Gruppe im Median immer 0 betragen. Das bedeutet, dass der Rezeptor in der SZNSL-Gruppe nicht exprimiert wird. Die Hypothesen, CD20 und CXCR5 werden bei Mäusen mit einem primären B-Zell-Lymphombefall ko-exprimiert und CXCR5 wird im Allgemeinen bei Mäusen mit einem primären B-Zell-Lymphombefall höher exprimiert als bei Mäusen mit einem sekundären B-Zell-Lymphombefall, konnten somit bestätigt werden. Die gefundenen Ergebnisse passen gut zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen.

CXCR5 und sein Ligand CXCL13 scheinen so von besonderer Bedeutung für das Homing von Lymphomzellen zu sein. Da CXCR5 in dieser Arbeit von allen Rezeptoren am meisten ko-exprimiert wurde, vermuten wir, dass die CXCR5-CXCL13-Achse besonders relevant für das Homing und die Pathogenese von PVRL und PZNSL ist.

4.3.3 Ko-Expression von CD20 und CXCR7

CXCR7, ein negativer Regulator von CXCR4, bindet ebenfalls an den Liganden CXCL12. Die CXCR4-CXCR7-CXCL12-Achse gilt bei vielen Krebsarten, wie z.B. Brust- und Prostatakrebs, als wichtiger Signalweg für Wachstum und Überleben

dieser Tumore, aber auch für die Entwicklung von Therapieresistenzen. Ob CXCR7 zur Metastasierung beitragen kann oder diese sogar verhindert, ist in der Literatur umstritten(126,107,108,127,128). Auch bei Non-Hodgkin-Lymphomen gilt CXCR7 als mit ursächlich für die Pathogenese dieser Erkrankungen. Zabel et al. (2011) untersuchten beispielsweise die transendotheliale Migration (TEM) einer humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinie in vitro und konnten zeigen, dass TEM besonders ausgeprägt bei CXCR4/CXCR7-positive Lymphomzellen in Gegenwart von CXCL12 zu beobachten war(129).

Puddino et al. (2017) untersuchten die Expression von CXCR7 in einem Xenograft-Mausmodell. Bei diesem Modell wurden humane DLBCL-Zellen subkutan bzw. intravenös NOD/SCID-Mäusen injiziert. Interessanterweise gelangten CXCR7-positive DLBCL-Zellen in das Knochenmark, die Milz, das Gehirn und die Lunge, wohingegen CXCR7-knockout DLBCL-Zellen die Organe deutlich seltener infiltrierten. Trotzdem wird auch beschrieben, dass nur ein kleiner Teil der DLBCL-Zellen CXCR7 auf ihrer Oberfläche exprimieren, obwohl der Anteil der mRNA-Transkripte von CXCR7 bei den CXCR7-positiven und -negativen Zellen gleich war. Es besteht daher die Möglichkeit, dass CXCR7 vorrangig intrazellulär gespeichert und nur bei bestimmten Stimuli vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert wird(130).

Moreno et al. (2018) konnten durch Untersuchungen an Patientenproben beweisen, dass DLBCL, welche CXCR7 vermehrt exprimieren, eine günstigere Prognose aufweisen und mit einem längeren Überleben assoziiert waren als CXCR7-negative Lymphome. CXCR7 wirkt als negativer Regulator auf CXCR4, welcher als prognostisch ungünstiger Faktor gilt. Damit reguliert CXCR7 gegebenenfalls die aggressive Wirkung von CXCR4(131).

Die Ergebnisse unserer Arbeit zeigen, dass sich sowohl in der Choroidea als auch in der Retina, dem Ziliarkörper und dem Sehnerv kaum CD20-positive Zellen fanden, welche zusätzlich den Rezeptor CXCR7 exprimierten. Auch die Auswertung mit dem IRS legte nahe, dass CXCR7 in der PZNSL-Gruppe nicht höher exprimiert wird als in der SZNSL-Gruppe. Damit konnten die Hypothesen, CD20 und CXCR7 werden bei Mäusen mit einem primären B-Zell-Lymphombefall ko-exprimiert und CXCR7 wird im Allgemeinen bei Mäusen mit einem primären B-Zell-Lymphombefall

höher exprimiert als bei Mäusen mit einem sekundären B-Zell-Lymphombefall, nicht bestätigt werden.

Unsere Ergebnisse stimmen nicht mit denen von Puddino et al. (2017)(130) überein. Möglicherweise handelt es sich bei dem in dieser Arbeit untersuchtem PVRL um eine aggressive Variante eines DLBCL, bei dem CXCR7 kaum exprimiert wird. Auch ist es möglich, dass die Mikroumgebung in diesem PDX-Mausmodell eine vermehrte Expression von CXCR7 unterdrückte bzw. nicht förderte. So könnte die niedrige Expression von CXCR7 in diesem Fall sogar die Expression von CXCR4 positiv beeinflusst haben. Sicher ist, dass die Rolle von CXCR7 beim Homing von B-Lymphomzellen weiterhin unklar ist und kontrovers diskutiert und erforscht werden muss.

4.3.4 Ko-Expression von CD20 und CD44

CD44, ein multifunktionales Zelloberflächenmolekül und Rezeptor, wird bei vielen Krebsarten vermehrt exprimiert. Meist ist CD44 mit einer besseren Prognose assoziiert, dieses gilt allerdings nicht für NHL. Der Rezeptor spielt eine Rolle bei der Proliferation, Migration und Angiogenese bei verschiedenen soliden humanen Tumoren wie z.B. Brustkrebs. Außerdem kann CD44 an der Präsentation von Chemokinen beteiligt sein(132–140).

Leider fanden sich keine Arbeiten zur Expression von CD44 in PVRL. Da PVRL aber eng mit PZNSL verwandt ist, sollten die Ergebnisse von Studien zur Expression von CD44 beim PZNSL mit PVRL vergleichbar sein. CD44 wird schon seit längerer Zeit als Homing-Rezeptor für PZNSL diskutiert. Aho et al. (1993) untersuchten in ihrer Arbeit sowohl chirurgische Proben als auch Material von Autopsien von PZNSL-Patienten mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen. Es fanden sich sowohl CD44-positive Lymphomzellen als auch CD44-positive Gefäßendothelien(4). Weiterhin zeigten Aho et al. (1994) in einem in vitro Modell, dass humane CD44-positive B-Lymphozyten durch Bindung an Hyaluronsäure die weiße Substanz des Gehirns infiltrieren können. Diese Infiltration nahm ab, wenn sowohl die Lymphozyten als auch das Hirngewebe entweder mit Hyaluronidasen oder mit CD44-Antikörpern behandelt wurden. Dies legt nahe, dass das CD44-vermittelte Homing der Lymphozyten von der Expression von Hyaluronsäure abhängt und nicht

von anderen möglichen CD44-Liganden wie z.B. Kollagen(141). Auch die Untersuchungen von Yuan et al. (2013) wiesen eine Expression von CD44 in PZNSL-Patientenproben nach(142). Lemma et al. (2017) untersuchten in einer weiteren Arbeit die Expression von CD44 Proben von Patienten mit PZNSL, SZNSL und systemischen DLBCL mittels immunhistochemischen Färbungen. CD44 war in dieser Arbeit bei PZNSL am höchsten exprimiert(143).

Interessanterweise fanden He et al. (2013) in einem PZNSL-Mausmodell, in dem humane DLBCL-Zellen in BALB/c-Mäusen intrazerebral injiziert wurden, ähnliche Ergebnisse. Die Tumorzellen, welche sich häufig perivaskulär fanden, waren CD44-positiv. Außerdem wurden PZNSL-Patientenproben untersucht, welche ebenfalls CD44-positiv waren. Lymphome, die CD44-positiv waren, waren zudem mit einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert als CD44-negative PZNSL(144).

Auch bei primären testikulären Lymphomen wurde die Expression von CD44 untersucht. Horstmann et al. (1996) wiesen CD44 in Patientenproben von testikulären DLBCL mit immunhistochemischen Färbungen nach(145). In der Arbeit von Hasselblom et al. (2004) war CD44 besonders hoch exprimiert bei Patienten mit testikulären DLBCL im späten Krankheitsstadium(146). Auch die bereits beschriebene Studie von Menter et al. (2014) fand in fast allen humanen testikulären DLBCL-Proben CD44-positive Lymphomzellen(117).

Im Gegensatz zu all diesen Erkenntnissen wurde CD44 in unserem Modell nur von sehr wenigen CD20-positiven Zellen in der Choroidea und Retina ko-exprimiert. Im Ziliarkörper fand sich außerdem keine Ko-Expression dieser beiden Rezeptoren. Dennoch wurde CD44 in der Choroidea der PZNSL signifikant höher exprimiert als in der Choroidea der SZNSL-Gruppe. Interessanterweise zeigten sich CD44-positive Zellen in Kapillaren in unmittelbarer Nähe zu CD20-positiven Lymphomzellen. Wir gehen daher davon aus, dass es sich hier um CD44-positive Leukozyten (59,80–82) wie z.B. Monozyten oder Makrophagen handelt, welche an der Extravasation der Lymphozyten beteiligt sind, indem sie Chemokine präsentieren(132). CD44 auf Lymphomzellen könnte auch zu deren Homing und Diapedese beitragen, da sich Hyaluronsäure, der Ligand von CD44, häufig von Gefäßendothelien gebildet wird, aber auch eine der Hauptkomponenten der

extrazellulären Matrix des Gehirns ist und ebenfalls im Glaskörper der Auges vorkommt(2,147). Möglicherweise lässt sich die geringe Anzahl von CD20/CD44-positiven Lymphomzellen mit der Anzahl der CD20/CXCR4-positiven Lymphomzellen erklären. Da die CXCL12-CXCR4-Achse die Expression und Aktivierung von CD44 beeinflussen kann (148), ist der Anteil von CD20/CXCR4-positiven Zellen an allen CD20-positiven Lymphomzellen mit 15% möglicherweise zu gering, um CD44 ebenfalls vermehrt zu exprimieren.

Daher können die Hypothesen, CD20 und CD44 werden bei Mäusen mit einem primären B-Zell-Lymphombefall ko-exprimiert und CD44 wird im Allgemeinen bei Mäusen mit einem primären B-Zell-Lymphombefall höher exprimiert als bei Mäusen mit einem sekundären B-Zell-Lymphombefall, nicht eindeutig bestätigt werden. Aber CD44 ist für das PZNSL und somit auch für das PVRL ein interessanter Rezeptor, der durchaus für das Homing von Lymphomzellen in das Auge verantwortlich sein kann. CD44 sollte für das PVRL in Zukunft weiter erforscht werden.

4.4 Limitationen

Als Erstes muss beachtet werden, dass die Daten dieser Arbeit an einem PDX-Mausmodell erhoben worden sind. Die Ergebnisse lassen sich demnach nicht ohne Weiteres direkt auf den Menschen übertragen. So sind in diesem Modell entgegen der humanen Situation Lymphomzellen nicht im RPE zu finden, wobei diese Struktur mit Hilfe der Immunfluoreszenz methodisch nur eingeschränkt beurteilbar ist. Hinzu kommt die leicht unterschiedliche Morphologie der Mausretina(149). Trotzdem ist ein Mausmodell für uns die beste Möglichkeit, das Homing von B-Lymphomzellen für das PVRL zu untersuchen. Da das PVRL eine sehr seltene Erkrankung ist (22,32,33), gestalten sich experimentelle Studien an Patientenproben schwierig, da ein langer Zeitraum nötig wäre, um eine ausreichend hohe Fallzahl zu erlangen. Zudem bietet das hier genutzte PDX-Mausmodell einige Vorteile gegenüber konventionellen Xenograft-Mausmodellen. Letztere arbeiten mit humanen Krebszelllinien, welche durch zahlreiche Selektionsprozesse die genetische Heterogenität des ursprünglichen Tumors kaum widerspiegeln. In einem PDX-Modell werden die Zellen nicht in vitro kultiviert, wodurch die Heterogenität der Tumorzellen auch über viele Generationen erhalten bleibt(150). Dies ist

entscheidend für eine realistische Interaktion der malignen Zellen mit der Mikroumgebung des Modellorganismus und somit auch für die Untersuchung von Homingmechanismen beim PVRL. Daher bietet ein Xenograft-Mausmodell, welches mit humanen Lymphomzellen aus Patientenproben (PDX) arbeitet, eine sehr gute Möglichkeit, dass PVRL in vivo zu untersuchen.

In diesem PDX-Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass CD20-positive Lymphomzellen ebenfalls die Homingrezeptoren CXCR4, CXCR5 und CD44 exprimieren. Für einen eindeutigen Nachweis einer Überexpression dieser Rezeptoren wären aber zusätzlich quantitative Messmethoden wie PCR-Untersuchungen nötig. Diese können in eventuellen nachfolgenden Experimenten angestrebt werden. Für eine erste orientierende Untersuchung sind die durchgeführten doppelten Immunfluoreszenzfärbungen aber durchaus aussagekräftig. Wichtig ist dabei, dass die Färbungen gewissenhaft etabliert und durchgeführt werden, so wie es in dieser Arbeit erfolgt ist.

Für eine umfassendere Beurteilung der Rolle der für das Homing relevanten Rezeptoren CXCR4, CXCR5 und CD44 wäre es sinnvoll, ebenfalls die Expression von den Liganden dieser Rezeptoren (CXCL12, CXCL13 und HA) in den PDX-Mausmodellen zu untersuchen. Hier können analog Immunfluoreszenzfärbungen und PCR-Untersuchungen angestrebt werden. Dadurch ließe sich beurteilen, ob in den Augen, in denen die Homingrezeptoren gefunden wurden, ebenfalls deren Chemokinliganden vermehrt exprimiert werden. Wir vermuten, dass CXCL12, CXCL13 und HA in den Augen der PZNSL-Gruppe ebenfalls vermehrt exprimiert werden. Andere Autoren beschreiben analog dazu eine Expression von diesen Chemokinen bzw. Liganden bei Patienten mit PVRL und PZNSL(38,114,83,115). Dieses Zusammenspiel der Überexpression der Chemokinrezeptoren auf den Lymphomzellen und deren Liganden im Zielorgan Auge kann so das Homing der Lymphomzellen vermitteln.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Lymphomzellen in einem PDX-PZNSL-Mausmodell im Vergleich zu einem PDX-SZNSL Mausmodell neben CD20 zusätzlich die Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR5 und CD44 exprimieren. Diese Rezeptoren können daher am Homing von B-Lymphomzellen maßgeblich beteiligt sein und so einen Erklärungsansatz für die Pathogenese des PVRL liefern.

Die Rolle der Rezeptoren CXCR4, CXCR5 und CD44 beim Homing von B-Lymphomzellen kann in Knockout-Modellen weiterhin charakterisiert werden. So konnten bereits He et al. (2021) in ihrem in vitro Modell zeigen, dass DLBCL-Zellen, welche mit den RNA silencing Vektoren siCXCR4 und siCD44 behandelt wurden, in ihren Fähigkeiten der Invasion und Migration deutlich eingeschränkt waren. Im in vivo ZNS-Xenograft-Mausmodell dieser Arbeitsgruppe zeigten die mit siCXCR4 und siCD44 vorbehandelten Zellen ein eingeschränktes Tumorstadium und die Mäuse zeigten ein längeres Gesamtüberleben(151). Ähnliche Studien sollten auch für die anderen Rezeptoren CXCR5 und CXCR7 und die Liganden CXCL12, CXCL13 und HA durchgeführt werden, um den Einfluss der Chemokinrezeptoren und der Chemokine auf das B-Zell-Homing beim PVRL weiter zu untersuchen.

Die Arbeit von He et al. (2021) zeigt außerdem, dass die Chemokinrezeptoren ein interessanter Ansatzpunkt für die Therapie der primären Lymphome PVRL, PZNSL und PTL sein kann, da siCXCR4 und siCD44 einen Einfluss auf den Tumorstadium und das Gesamtüberleben zeigten(151). Es gibt bereits wenige Studien, die Anti-CXCR4-Therapien in vivo untersuchen. Liu et al. (2017) nutzen beispielsweise ein Xenograft-Mausmodell, in dem NHL-Tumorzellen subkutan (s.c.) in weibliche SCID-Mäuse injiziert wurden. CXCR4 wurde in diesem Modell stark exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass der humanisierte IgG1-Antikörper PF-06747143 nicht nur spezifisch an CXCR4 band, sondern auch das Tumorstadium effektiv inhibierte und zudem die initiale Tumormasse reduzieren konnte(152). Eine Therapie mit einem Anti-CXCR4-Antikörper scheint also ein möglicher neuer Ansatzpunkt für die Therapie von PVRL zu sein. Bei positiven Knockout-Modellen könnten auch Antikörper-Therapien für die anderen Mediatoren CXCR5, CXCR7 und CD44 vielversprechend sein.

Es lässt sich somit abschließend festhalten, dass die untersuchten Rezeptoren CXCR4, CXCR5 und CD44, welche in dieser Arbeit in einem PDX-Mausmodell für das PVRL auf CD20-positiven Lymphomzellen nachgewiesen wurden, von besonderem Interesse für das Homing von malignen B-Lymphomzellen sind. Auch CXCR7 soll nicht aus dem Fokus geraten, auch wenn der Rezeptor in dieser Arbeit nicht auf CD20-positiven Lymphomzellen nachgewiesen werden konnte. All diese Homing-Rezeptoren sollten weiterhin beforscht werden und könnten mögliche neue Ansatzpunkte für zukünftige Immuntherapien für das PVRL darstellen.

6 Zusammenfassung

Einleitung Das primäre vitreoretinale Lymphom (PVRL) ist eine seltene, aggressive hämatogene Krebserkrankung des Auges. Häufig ist das PVRL mit einem primären ZNS-Lymphomen (PZNSL) assoziiert. Bis heute ist die Pathogenese des PVRL weitgehend ungeklärt. Aufgrund aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisse spricht beim PVRL viel dafür, dass Lymphomzellen außerhalb des Auges entarten und anschließend mit Hilfe bestimmter Rezeptoren, wie z.B. CXCR4, CXCR5, CXCR7 und CD44, in das Auge gelangen. Dieser Vorgang wird als Homing bezeichnet. Ziel dieser Studie ist es, die Ko-Expression vom B-Zell-Marker CD20 und den Homing-Rezeptoren auf B-Lymphomzellen in den möglichen morphologischen Zielstrukturen des PVRL zu testen.

Methoden Mit Hilfe eines primären ZNS-Mausmodells (PZNSL-Gruppe) wurde im Vergleich zu einem sekundären ZNS-Mausmodell (SZNSL-Gruppe) eine PVRL-Situation etabliert. Hierfür wurden PZNSL- bzw. SZNSL-Zellen aus Patientenproben intrasplenisch in NSG-Mäuse injiziert. Auf den entnommenen Augen beider Modelle ($n_{PZNSL}=13$, $n_{SZNSL}=10$) wurden mit doppelter Immunfluoreszenzfärbung die Rezeptoren CD20/CXCR4, CD20/CXCR5, CD20/CXCR7 und CD20/CD44 gefärbt. Die Auswertung der Expressionsstärke der jeweiligen Rezeptoren in der Choroidea, der Retina, des Ziliarkörpers und des Sehnervs erfolgte mit dem immunreaktiven Score (IRS). Für die statistische Auswertung der ordinalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

Ergebnisse 11/13 paarigen Augen der PZNSL-Gruppe, aber keine Augen der SZNSL-Gruppe, zeigten eine Infiltration mit CD20-positiven Zellen besonders in der Choroidea, aber auch in der Retina und dem Ziliarkörper. Vor allem die Choroidea der PZNSL-Gruppe war mit CD20/CXCR4-positiven, CD20/CXCR5-positiven, wenigen CD20/CD44-positiven, aber keinen CD20/CXCR7-positiven Zellen infiltriert. In der Retina wurden weniger ko-exprimierende Zellen gefunden. Auch im Sehnerv der PZNSL-Gruppe zeigten sich doppelt positive Zellen. Die Auswertung mit IRS ergab signifikant erhöhte Expressionen von CXCR4 ($p \approx 0,02$), CXCR5 ($p=0,004$) und CD44 ($p > 0,001$) in der Choroidea der PZNSL-Gruppe. In der Retina

war CD20 in der PZNSL-Gruppe signifikant höher exprimiert. Die Expressionsstärke von CXCR7 unterschied sich in beiden Gruppen nicht. In dem Sehnerven fanden sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Diskussion Insgesamt unterstützen diese Ergebnisse somit die These, dass die untersuchten Rezeptoren am Homing von CD20-positiven Lymphomzellen in das Auge beteiligt sein und somit mit ursächlich für die Entstehung von PVRL sein können. Das untersuchte Mausmodell ist somit ein erstes Homing-Modell für das PVRL. Die weitere Untersuchung der Homing-Rezeptoren, insbesondere auch der Downstream-Signalwege, sind somit vielversprechende zukünftige Forschungsziele.

7 Literatur

1. Naumann GOH, Apple DJ, Deuble-Bente K, von Domarus D, Funk RHW, Hinzpeter EN, u. a. Pathologie des Auges. 1.-2. Bd. I. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1997.
2. Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Maio G, Artur M, u. a. Duale Reihe, Anatomie. 3. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2014.
3. Ulfing N. Kurzlehrbuch Histologie. 4. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2015.
4. Aho R, Ekfors T, Haltia M, Kalimo H. Pathogenesis of primary central nervous system lymphoma: invasion of malignant lymphoid cells into and within the brain parenchyme. *Acta Neuropathol.* Juni 1993;86(1):71–6.
5. Li J, Okamoto H, Yin C, Jagannathan J, Takizawa J, Aoki S, u. a. Proteomic characterization of primary diffuse large B-cell lymphomas in the central nervous system. *JNS.* September 2008;109(3):536–46.
6. Zhao S, Zhu W, Xue S, Han D. Testicular defense systems: immune privilege and innate immunity. *Cell Mol Immunol.* September 2014;11(5):428–37.
7. Medawar PB. Immunity to Homologous Grafted Skin. III. The Fate of Skin Homographs Transplanted to the Brain, to Subcutaneous Tissue, and to the Anterior Chamber of the Eye. *Br J Exp Pathol.* Februar 1948;29(1):58–69.
8. Benhar Inbal, London A, Schwartz M. The privileged immunity of immune privileged organs: the case of the eye. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2012 [zitiert 16. Januar 2022];3. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2012.00296>
9. Mugnaini EN, Ghosh N. Lymphoma. Primary Care: Clinics in Office Practice. Dezember 2016;43(4):661–75.
10. Ansell SM. Hodgkin lymphoma: A 2020 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* August 2020;95(8):978–89.
11. Matasar MJ, Zelenetz AD. Overview of Lymphoma Diagnosis and Management. *Radiologic Clinics of North America.* März 2008;46(2):175–98.
12. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet.* September 2012;380(9844):848–57.
13. Robert Koch-Institut (Hrsg). und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Krebs in Deutschland für 2017/2018. Berlin; 2021. Report No.: 13.

14. Pavlasova G, Mraz M. The regulation and function of CD20: an “enigma” of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica*. Juni 2020;105(6):1494–506.
15. Chihara D, Nastoupil LJ, Williams JN, Lee P, Koff JL, Flowers CR. New insights into the epidemiology of non-Hodgkin lymphoma and implications for therapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. Mai 2015;15(5):531–44.
16. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, u. a. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 19. Mai 2016;127(20):2375–90.
17. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin’s Disease Staging Classification. *Cancer Res*. 1. November 1971;31(11):1860–1.
18. Armitage JO. Staging Non-Hodgkin Lymphoma. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2005;55(6):368–76.
19. Kakkassery V, Jünemann AM, Bechrakis NE, Grisanti S, Ranjbar M, Zschoche M, u. a. Lymphom am Auge: Präzise Diagnostik und Klassifikation als Schlüssel einer erfolgreichen personalisierten Therapie. *Ophthalmologe*. Juni 2020;117(6):499–507.
20. Maheshwari A, Finger PT. Cancers of the eye. *Cancer Metastasis Rev*. Dezember 2018;37(4):677–90.
21. Tang LJ, Gu CL, Zhang P. Intraocular lymphoma. *Int J Ophthalmol*. 18. August 2017;10(8):1301–7.
22. Zschoche M, Emmert S, von Bubnoff N, Ranjbar M, Grisanti S, Heindl LM, u. a. Augenbefall und Systemerkrankung – periokuläre und intraokuläre Lymphome. *Onkologe*. November 2020;26(11):1056–64.
23. Coupland SE, Anastassiou G, Bornfeld N, Hummel M, Stein H. Primary intraocular lymphoma of T-cell type: report of a case and review of the literature. *Graefe’s Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1. März 2005;243(3):189–97.
24. Kakkassery V, Coupland SE, Heindl LM. Iris lymphoma—a systematic guide for diagnosis and treatment. *Survey of Ophthalmology*. Januar 2021;66(1):41–53.
25. Sobolewska B, Chee SP, Zaguia F, Goldstein DA, Smith JR, Fend F, u. a. Vitreoretinal Lymphoma. *Cancers (Basel)*. 4. August 2021;13(16):3921.
26. Stübiger N, Kakkassery V, Gundlach E, Winterhalter S, Pleyer U. Diagnostik und Therapie des primären vitreoretinalen Lymphoms. *Ophthalmologe*. März 2015;112(3):223–30.

27. Venkatesh R, Bavaharan B, Mahendradas P, Yadav NK. Primary vitreoretinal lymphoma: prevalence, impact, and management challenges. *Clin Ophthalmol*. 14. Februar 2019;13:353–64.
28. Sagoo MS, Mehta H, Swampillai AJ, Cohen VML, Amin SZ, Plowman PN, u. a. Primary intraocular lymphoma. *Survey of Ophthalmology*. September 2014;59(5):503–16.
29. Coupland SE, Heimann H, Bechrakis NE. Primary intraocular lymphoma: a review of the clinical, histopathological and molecular biological features. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. November 2004;242(11):901–13.
30. Wright DH. Pathology of Extra-nodal non Hodgkin Lymphomas. *Clinical Oncology*. Juni 2012;24(5):319–28.
31. Coupland SE, Damato B. Understanding intraocular lymphomas. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. August 2008;36(6):564–78.
32. Piria R, Rommel F, Zimbelmann M, Erikson K, Babst N, Brosig A, u. a. [Retinal tumors in adults: Part 2 nonvascular tumors of retina and retinal pigment epithelium]. *Ophthalmologe*. November 2021;118(11):1153–60.
33. Jaehne D, Coupland SE. Primäre vitreoretinale Lymphome. *Ophthalmologe*. April 2018;115(4):343–56.
34. Chan C, Rubenstein JL, Coupland SE, Davis JL, Harbour JW, Johnston PB, u. a. Primary Vitreoretinal Lymphoma: A Report from an International Primary Central Nervous System Lymphoma Collaborative Group Symposium. *The Oncologist*. November 2011;16(11):1589–99.
35. Fend F, Ferreri AJM, Coupland SE. How we diagnose and treat vitreoretinal lymphoma. *Br J Haematol*. Juni 2016;173(5):680–92.
36. Steffen J, Coupland SE, Smith JR. Primary Vitreoretinal Lymphoma in HIV Infection. *Ocular Immunology and Inflammation*. 3. April 2021;29(3):621–7.
37. Araujo I, Coupland SE. Primary Vitreoretinal Lymphoma -- A Review. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. Juni 2017;6(3):283–9.
38. Chan CC, Shen D, Hackett JJ, Buggage RR, Tuailon N. Expression of chemokine receptors, CXCR4 and CXCR5, and chemokines, BLC and SDF-1, in the eyes of patients with primary intraocular lymphoma. *Ophthalmology*. Februar 2003;110(2):421–6.
39. Rajagopal R, Harbour JW. Diagnostic testing and treatment choices in primary vitreoretinal lymphoma. *Retina*. März 2011;31(3):435–40.
40. Farkas T, Harbour W, Dávila RM. Cytologic Diagnosis of Intraocular Lymphoma in Vitreous Aspirates. *Acta Cytologica*. 2004;48(4):487–91.

41. Wang Y, Shen D, Wang VM, Sen HN, Chan CC. Molecular Biomarkers for the Diagnosis of Primary Vitreoretinal Lymphoma. *IJMS*. 5. September 2011;12(9):5684–97.
42. Coupland SE, Loddenkemper C, Smith JR, Braziel RM, Charlotte F, Anagnostopoulos I, u. a. Expression of immunoglobulin transcription factors in primary intraocular lymphoma and primary central nervous system lymphoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. November 2005;46(11):3957–64.
43. Hashimoto S, Chiorazzi N, Gregersen PK. Alternative splicing of CD79a (Ig- α) and CD79b (Ig- β) RNA transcripts in human B cells. *Molecular Immunology*. Juni 1995;32(9):651–9.
44. Liu Y, Barta SK. Diffuse large B-cell lymphoma: 2019 update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol*. Mai 2019;94(5):604–16.
45. Kalogeropoulos D, Vartholomatos G, Mitra A, Elaraoud I, Ch'ng SW, Zikou A, u. a. Primary vitreoretinal lymphoma. *Saudi J Ophthalmol*. 2019;33(1):66–80.
46. Coupland SE, Chan CC, Smith J. Pathophysiology of Retinal Lymphoma. *Ocul Immunol Inflamm*. 2009;17(4):227–37.
47. Bonzheim I, Giese S, Deuter C, Süsskind D, Zierhut M, Waizel M, u. a. High frequency of MYD88 mutations in vitreoretinal B-cell lymphoma: a valuable tool to improve diagnostic yield of vitreous aspirates. *Blood*. 2. Juli 2015;126(1):76–9.
48. Kakkassery V, Schroers R, Coupland SE, Wunderlich MI, Schargus M, Heinz C, u. a. Vitreous microRNA levels as diagnostic biomarkers for vitreoretinal lymphoma. *Blood*. 8. Juni 2017;129(23):3130–3.
49. Chan CC, Rubenstein JL, Coupland SE, Davis JL, Harbour JW, Johnston PB, u. a. Primary Vitreoretinal Lymphoma: A Report from an International Primary Central Nervous System Lymphoma Collaborative Group Symposium. *Oncologist*. November 2011;16(11):1589–99.
50. King RL, Goodlad JR, Calaminici M, Dotlic S, Montes-Moreno S, Oschlies I, u. a. Lymphomas arising in immune-privileged sites: insights into biology, diagnosis, and pathogenesis. *Virchows Arch*. Mai 2020;476(5):647–65.
51. Nakamura M, Shimada K, Ishida E, Konishi N. Histopathology, pathogenesis and molecular genetics in primary central nervous system lymphomas. *Histol Histopathol*. Januar 2004;19(1):211–9.
52. Hochberg FH, Miller DC. Primary central nervous system lymphoma. *Journal of Neurosurgery*. Juni 1988;68(6):835–53.
53. Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Genetics of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 24. Mai 2018;131(21):2307–19.

54. Gowans JL, Knight EJ. The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. *Proc R Soc Lond B*. 14. Januar 1964;159(975):257–82.
55. Kieran MW, Blank V, le Bail O, Israel A. Lymphocyte homing. *Research in Immunology*. Januar 1989;140(4):399–450.
56. Hochman J, Assaf N, Deckert-Schlüter M, Wiestler OD, Pe'er J. Entry Routes of Malignant Lymphoma into the Brain and Eyes in a Mouse Model. *Cancer Res*. 1. Juli 2001;61(13):5242–7.
57. Burger JA, Kipps TJ. Chemokine Receptors and Stromal Cells in the Homing and Homeostasis of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells. *Leukemia & Lymphoma*. Januar 2002;43(3):461–6.
58. Hochman J, Shen D, Gottesman MM, Chan CC. Anti-LFA-1 antibodies enhance metastasis of ocular lymphoma to the brain and contralateral eye. *Clin Exp Metastasis*. Januar 2013;30(1):91–102.
59. Bröcker B, Schütt C, Fleischer B. *Grundwissen Immunologie* [Internet]. 4. Auflage. Berlin: Springer; 2019. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/978-3-662-58330-2>
60. Man S, Ubogu EE, Ransohoff RM. Inflammatory Cell Migration into the Central Nervous System: A Few New Twists on an Old Tale. *Brain Pathol*. 22. März 2007;17(2):243–50.
61. Babst N, Kakkassery V. Graphical_Abstract_Neele_Babst.jpeg (JPEG-Grafik, 3000 × 2100 Pixel) - Skaliert (31%) [Internet]. [zitiert 20. Mai 2022]. Verfügbar unter: https://www.uksh.de/uksh_media/Dateien_Kompetenzzentren_UKSH/UCCSH/Forschung/USCA/Winner_2022/Babst_+Neele/Graphical_Abstract_Neele_Babst-height-2100-width-3000.jpeg
62. Touitou V, Bodaghi B, de Kozak Y, LeHoang P, Sautès-Fridman C, Fisson S. Animal Models of Intraocular Lymphomas. *Ophthalmic Res*. 2008;40(3–4):208–11.
63. Aronow ME, Shen D, Hochman J, Chan CC. Intraocular Lymphoma Models. *Ocul Oncol Pathol*. April 2015;1(3):214–22.
64. Assaf N, Hasson T, Hoch-Marchaim H, Pe'er J, Gnessin H, Deckert-Schlüter M, u. a. An experimental model for infiltration of malignant lymphoma to the eye and brain. *Virchows Archiv*. 28. November 1997;431(6):459–67.
65. Chan CC, Fischette M, Shen D, Mahesh SP, Nussenblatt RB, Hochman J. Murine Model of Primary Intraocular Lymphoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Februar 2005;46(2):415–9.
66. Potter M. History of the BALB/c Family. In: Potter M, Herausgeber. *The BALB/c Mouse* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1985

- [zitiert 10. Januar 2022]. S. 1–5. (Clarke A, Compans RW, Cooper M, Eisen H, Goebel W, Koprowski H, u. a., Reihenherausgeber. *Current Topics in Microbiology and Immunology*; Bd. 122). Verfügbar unter: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-70740-7_1
67. Nonoyama S, Ochs HD. Immune Deficiency in SCID Mice. *International Reviews of Immunology*. Januar 1996;13(4):289–300.
 68. Li Z, Mahesh SP, Shen DF, Liu B, Siu WO, Hwang FS, u. a. Eradication of Tumor Colonization and Invasion by a B Cell–Specific Immunotoxin in a Murine Model for Human Primary Intraocular Lymphoma. *Cancer Res*. 1. November 2006;66(21):10586–93.
 69. Touitou V, Daussy C, Bodaghi B, Camelo S, de Kozak Y, Lehoang P, u. a. Impaired Th1/Tc1 Cytokine Production of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Model of Primary Intraocular B-Cell Lymphoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1. Juli 2007;48(7):3223.
 70. Mineo JF, Scheffer A, Karkoutly C, Nouvel L, Kerdraon O, Trauet J, u. a. Using Human CD20-Transfected Murine Lymphomatous B Cells to Evaluate the Efficacy of Intravitreal and Intracerebral Rituximab Injections in Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1. November 2008;49(11):4738.
 71. Ben Abdelwahed R, Donnou S, Ouakrim H, Crozet L, Cosette J, Jacquet A, u. a. Preclinical Study of Ublituximab, a Glycoengineered Anti-Human CD20 Antibody, in Murine Models of Primary Cerebral and Intraocular B-Cell Lymphomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 29. Mai 2013;54(5):3657.
 72. Isbell LK, Tschuch C, Doostkam S, Reinacher PC, Shoumariyeh K, Waldeck S, u. a. Homing von Lymphomzellen in einem primären ZNS Lymphom Xenograft Maus Modell. In: abstract #482. 2020.
 73. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1–CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*. November 2006;20(11):1915–24.
 74. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clinical Cancer Research*. 1. Juni 2010;16(11):2927–31.
 75. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J*. August 2018;285(16):2944–71.
 76. Janssens R, Struyf S, Proost P. The unique structural and functional features of CXCL12. *Cell Mol Immunol*. April 2018;15(4):299–311.
 77. Bhutto IA, McLeod DS, Merges C, Hasegawa T, Luttly GA. Localisation of SDF-1 and its receptor CXCR4 in retina and choroid of aged human eyes and in eyes with age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. Juli 2006;90(7):906–10.

78. Förster R, Mattis AE, Kremmer E, Wolf E, Brem G, Lipp M. A Putative Chemokine Receptor, BLR1, Directs B Cell Migration to Defined Lymphoid Organs and Specific Anatomic Compartments of the Spleen. *Cell*. Dezember 1996;87(6):1037–47.
79. Heesen M, Berman MA, Charest A, Housman D, Gerard C, Dorf ME. Cloning and chromosomal mapping of an orphan chemokine receptor: mouse RDC1. *Immunogenetics*. 26. März 1998;47(5):364–70.
80. Stamenkovic I, Amiot M, Pesando JM, Seed B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell*. März 1989;56(6):1057–62.
81. Nishina S, Hirakata A, Hida T, Sawa H, Azuma N. CD44 expression in the developing human retina. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*. Februar 1997;235(2):92–6.
82. Heldin P, Koliopoulos C, Lin CY, Heldin CH. Involvement of hyaluronan and CD44 in cancer and viral infections. *Cell Signal*. Januar 2020;65:109427.
83. Smith JR, Brazier RM, Paoletti S, Lipp M, Ugucioni M, Rosenbaum JT. Expression of B-cell-attracting chemokine 1 (CXCL13) by malignant lymphocytes and vascular endothelium in primary central nervous system lymphoma. *Blood*. 1. Februar 2003;101(3):815–21.
84. Bharadwaj AS, Stempel AJ, Olivas A, Franzese SE, Ashander LM, Ma Y, u. a. Molecular Signals Involved in Human B Cell Migration into the Retina: in vitro investigation of ICAM-1, VCAM-1 and CXCL13. *Ocul Immunol Inflamm*. Dezember 2017;25(6):811–9.
85. Itano N, Kimata K. Mammalian Hyaluronan Synthases. *IUBMB Life*. 2002;54(4):195–9.
86. Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes HG, u. a. CXCR7 Functions as a Scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One*. 11. Februar 2010;5(2):e9175.
87. Hussain M, Adah D, Tariq M, Lu Y, Zhang J, Liu J. CXCL13/CXCR5 signaling axis in cancer. *Life Sciences*. Juni 2019;227:175–86.
88. Jordan AR, Racine RR, Hennig MJP, Lokeshwar VB. The Role of CD44 in Disease Pathophysiology and Targeted Treatment. *Front Immunol [Internet]*. 21. April 2015 [zitiert 20. November 2019];6. Verfügbar unter: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2015.00182/abstract>
89. van Ipenburg JA, de Waard NE, Naus NC, Jager MJ, Paridaens D, Verdijk RM. Chemokine Receptor Expression Pattern Correlates to Progression of Conjunctival Melanocytic Lesions. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 15. Juli 2019;60(8):2950.

90. Humpert ML, Pinto D, Jarrossay D, Thelen M. CXCR7 influences the migration of B cells during maturation: Cellular immune response. *Eur J Immunol*. März 2014;44(3):694–705.
91. Zhou X, Mulazzani M, von Mücke-Heim IA, Langer S, Zhang W, Ishikawa-Ankerhold H, u. a. The Role of BAFF-R Signaling in the Growth of Primary Central Nervous System Lymphoma. *Front Oncol*. 27. Mai 2020;10:682.
92. Desai VD, Wang Y, Simirskii VN, Duncan MK. CD44 expression is developmentally regulated in the mouse lens and increases in the lens epithelium after injury. *Differentiation*. Februar 2010;79(2):111–9.
93. Saha A, Ahn S, Blando J, Su F, Kolonin MG, DiGiovanni J. Proinflammatory CXCL12-CXCR4/CXCR7 Signaling Axis Drives Myc-Induced Prostate Cancer in Obese Mice. *Cancer Res*. 15 2017;77(18):5158–68.
94. Liu Y, Yang Z, Lai P, Huang Z, Sun X, Zhou T, u. a. Bcl-6-directed follicular helper T cells promote vascular inflammatory injury in diabetic retinopathy. *Theranostics*. 2020;10(9):4250–64.
95. Shen J, Luo X, Wu Q, Huang J, Xiao G, Wang L, u. a. A Subset of CXCR5+CD8+ T Cells in the Germinal Centers From Human Tonsils and Lymph Nodes Help B Cells Produce Immunoglobulins. *Front Immunol*. 5. Oktober 2018;9:2287.
96. Xiao L, Jia L, Zhang Y, Yu S, Wu X, Yang B, u. a. Human IL-21+IFN- γ +CD4+ T cells in nasal polyps are regulated by IL-12. *Sci Rep*. Oktober 2015;5(1):12781.
97. Cao X, Li W, Liu Y, Huang H, Ye CH. The Anti-Inflammatory Effects of CXCR5 in the Mice Retina following Ischemia-Reperfusion Injury. *Biomed Res Int [Internet]*. 4. Juli 2019 [zitiert 16. November 2019];2019. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6637708/>
98. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, u. a. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. Juli 2012;9(7):676–82.
99. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*. Mai 1987;8(3):138–40.
100. Babst N, Isbell LK, Rommel F, Tura A, Ranjbar M, Grisanti S, u. a. CXCR4, CXCR5 and CD44 May Be Involved in Homing of Lymphoma Cells into the Eye in a Patient Derived Xenograft Homing Mouse Model for Primary Vitreoretinal Lymphoma. *International Journal of Molecular Sciences*. Oktober 2022;23(19):11757.

101. Levy-Clarke GA, Greenman D, Sieving PC, Byrnes G, Nussenblatt R, Chan CC. Ophthalmic Manifestations, Cytology, Immunohistochemistry and Molecular Analysis of Intraocular Metastatic T-Cell Lymphoma: Report of a Case and Review of the Literature. *Surv Ophthalmol.* 2008;53(3):285–95.
102. Brunn A, Montesinos-Rongen M, Strack A, Reifenberger G, Mawrin C, Schaller C, u. a. Expression pattern and cellular sources of chemokines in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol.* 3. August 2007;114(3):271–6.
103. Cheah CY, George A, Giné E, Chiappella A, Kluin-Nelemans HC, Jurczak W, u. a. Central nervous system involvement in mantle cell lymphoma: clinical features, prognostic factors and outcomes from the European Mantle Cell Lymphoma Network. *Annals of Oncology.* August 2013;24(8):2119–23.
104. Fend F, Bonzheim I, Kakkassery V, Heindl LM, Illerhaus G. [Lymphoma of the eye and its adnexa : Modern pathological diagnostics and systemic treatment]. *Ophthalmologie.* Juli 2022;119(7):664–74.
105. Chatterjee S, Azad BB, Nimmagadda S. The Intricate Role of CXCR4 in Cancer. *Adv Cancer Res.* 2014;124:31–82.
106. Teicher BA. Antiangiogenic agents and targets: A perspective. *Biochem Pharmacol.* 1. Januar 2011;81(1):6–12.
107. Gahan JC, Gosalbez M, Yates T, Young EE, Escudero DO, Chi A, u. a. Chemokine and chemokine receptor expression in kidney tumors: molecular profiling of histological subtypes and association with metastasis. *J Urol.* März 2012;187(3):827–33.
108. D’Alterio C, Consales C, Polimeno M, Franco R, Cindolo L, Portella L, u. a. Concomitant CXCR4 and CXCR7 expression predicts poor prognosis in renal cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* November 2010;10(7):772–81.
109. Wagner PL, Hyjek E, Vazquez MF, Meherally D, Liu YF, Chadwick PA, u. a. CXCL12 and CXCR4 in adenocarcinoma of the lung: association with metastasis and survival. *J Thorac Cardiovasc Surg.* März 2009;137(3):615–21.
110. Rhodes LV, Short SP, Neel NF, Salvo VA, Zhu Y, Elliott S, u. a. Cytokine receptor CXCR4 mediates estrogen-independent tumorigenesis, metastasis, and resistance to endocrine therapy in human breast cancer. *Cancer Res.* 15. Januar 2011;71(2):603–13.
111. Su L, Zhang J, Xu H, Wang Y, Chu Y, Liu R, u. a. Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res.* 1. Dezember 2005;11(23):8273–80.

112. Li G, Badin G, Zhao A, Gentil-Perret A, Tostain J, Péoc'h M, u. a. Prognostic value of CXCR4 expression in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Histol Histopathol.* September 2013;28(9):1217–22.
113. Chen J, Xu-Monette ZY, Deng L, Shen Q, Manyam GC, Martinez-Lopez A, u. a. Dysregulated CXCR4 expression promotes lymphoma cell survival and independently predicts disease progression in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget* [Internet]. 20. März 2015 [zitiert 19. November 2019];6(8). Verfügbar unter: <http://www.oncotarget.com/fulltext/3343>
114. Chan CC. Molecular pathology of primary intraocular lymphoma. *American Journal of Ophthalmology.* Mai 2004;137(5):975.
115. Lemma SA, Pasanen AK, Haapasaari KM, Sippola A, Sormunen R, Soini Y, u. a. Similar chemokine receptor profiles in lymphomas with central nervous system involvement - possible biomarkers for patient selection for central nervous system prophylaxis, a retrospective study. *Eur J Haematol.* Mai 2016;96(5):492–501.
116. Smith JR, Falkenhagen KM, Coupland SE, Chipps TJ, Rosenbaum JT, Brazier RM. Malignant B Cells From Patients With Primary Central Nervous System Lymphoma Express Stromal Cell-Derived Factor-1. *Am J Clin Pathol.* April 2007;127(4):633–41.
117. Menter T, Ernst M, Drachneris J, Dirnhofner S, Barghorn A, Went P, u. a. Phenotype profiling of primary testicular diffuse large B-cell lymphomas: Phenotype profiling of tDLBCL. *Hematol Oncol.* Juni 2014;32(2):72–81.
118. Ollikainen RK, Kotkaranta PH, Kempainen J, Teppo HR, Kuitunen H, Pirinen R, u. a. Different chemokine profile between systemic and testicular diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma.* 29. Juli 2021;62(9):2151–60.
119. Panse J, Friedrichs K, Marx A, Hildebrandt Y, Luetkens T, Barrels K, u. a. Chemokine CXCL13 is overexpressed in the tumour tissue and in the peripheral blood of breast cancer patients. *Br J Cancer.* 16. September 2008;99(6):930–8.
120. Singh R, Gupta P, Kloecker GH, Singh S, Lillard JW. Expression and clinical significance of CXCR5/CXCL13 in human non-small cell lung carcinoma. *Int J Oncol.* Dezember 2014;45(6):2232–40.
121. Singh S, Singh R, Singh UP, Rai SN, Novakovic KR, Chung LWK, u. a. Clinical and biological significance of CXCR5 expressed by prostate cancer specimens and cell lines. *Int J Cancer.* 15. November 2009;125(10):2288–95.
122. Zheng Z, Cai Y, Chen H, Chen Z, Zhu D, Zhong Q, u. a. CXCL13/CXCR5 Axis Predicts Poor Prognosis and Promotes Progression Through PI3K/AKT/mTOR Pathway in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Front Oncol.* 2018;8:682.

123. Zhu Z, Zhang X, Guo H, Fu L, Pan G, Sun Y. CXCL13-CXCR5 axis promotes the growth and invasion of colon cancer cells via PI3K/AKT pathway. *Mol Cell Biochem.* Februar 2015;400(1–2):287–95.
124. Hu C, Xiong J, Zhang L, Huang B, Zhang Q, Li Q, u. a. PEG10 activation by co-stimulation of CXCR5 and CCR7 essentially contributes to resistance to apoptosis in CD19+CD34+ B cells from patients with B cell lineage acute and chronic lymphocytic leukemia. *Cell Mol Immunol.* August 2004;1(4):280–94.
125. Meijer J, Zeelenberg IS, Sipos B, Roos E. The CXCR5 chemokine receptor is expressed by carcinoma cells and promotes growth of colon carcinoma in the liver. *Cancer Res.* 1. Oktober 2006;66(19):9576–82.
126. Shi Y, Riese DJ, Shen J. The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis in Cancer. *Front Pharmacol.* 8. Dezember 2020;11:574667.
127. Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, u. a. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2. Oktober 2007;104(40):15735–40.
128. Hernandez L, Magalhaes MAO, Coniglio SJ, Condeelis JS, Segall JE. Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res.* 2011;13(6):R128.
129. Zabel BA, Lewén S, Berahovich RD, Jaén JC, Schall TJ. The novel chemokine receptor CXCR7 regulates trans-endothelial migration of cancer cells. *Mol Cancer.* 14. Juni 2011;10:73.
130. Puddinu V, Casella S, Radice E, Thelen S, Dirnhofer S, Bertoni F, u. a. ACKR3 expression on diffuse large B cell lymphoma is required for tumor spreading and tissue infiltration. *Oncotarget* [Internet]. 17. Oktober 2017 [zitiert 20. November 2019];8(49). Verfügbar unter: <http://www.oncotarget.com/fulltext/18844>
131. Moreno MJ, Gallardo A, Novelli S, Mozos A, Aragón M, Pavón MÁ, u. a. CXCR7 expression in diffuse large B-cell lymphoma identifies a subgroup of CXCR4+ patients with good prognosis. *PLoS One.* 19. Juni 2018;13(6):e0198789.
132. Naor D, Nedvetzki S, Golan I, Melnik L, Faitelson Y. CD44 in Cancer. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.* Januar 2002;39(6):527–79.
133. Saegusa M, Machida D, Hashimura M, Okayasu I. CD44 expression in benign, premalignant, and malignant ovarian neoplasms: relation to tumour development and progression. *J Pathol.* November 1999;189(3):326–37.
134. Stauder R, Eisterer W, Thaler J, Günthert U. CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood.* 15. Mai 1995;85(10):2885–99.

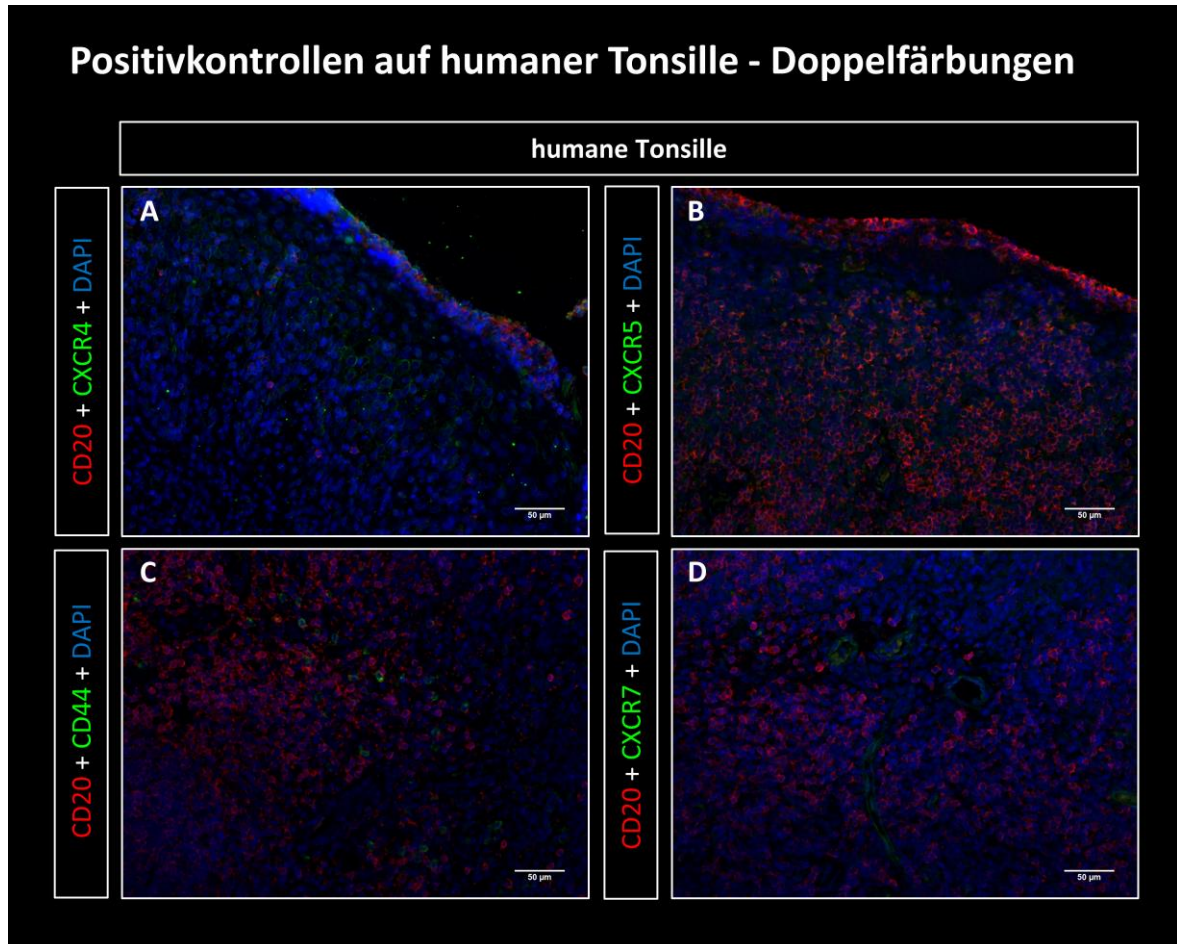
135. Ristamäki R, Joensuu H, Söderström KO, Jalkanen S. CD44v6 expression in non-Hodgkin's lymphoma: an association with low histological grade and poor prognosis. *J Pathol.* Juli 1995;176(3):259–67.
136. Hoogewerf AJ, Kuschert GS, Proudfoot AE, Borlat F, Clark-Lewis I, Power CA, u. a. Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry.* 4. November 1997;36(44):13570–8.
137. Sinn HP, Heider KH, Skroch-Angel P, von Minckwitz G, Kaufmann M, Herrlich P, u. a. Human mammary carcinomas express homologues of rat metastasis-associated variants of CD44. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36(3):307–13.
138. Ishida T. Immunohistochemical expression of the CD44 variant 6 in colorectal adenocarcinoma. *Surg Today.* 2000;30(1):28–32.
139. Bãnkfalvi A, Terpe HJ, Breukelmann D, Bier B, Rempe D, Pschadka G, u. a. Immunophenotypic and prognostic analysis of E-cadherin and beta-catenin expression during breast carcinogenesis and tumour progression: a comparative study with CD44. *Histopathology.* Januar 1999;34(1):25–34.
140. Pirinen R, Hirvikoski P, Böhm J, Kellokoski J, Moision K, Virén M, u. a. Reduced expression of CD44v3 variant isoform is associated with unfavorable outcome in non-small cell lung carcinoma. *Hum Pathol.* September 2000;31(9):1088–95.
141. Aho R, Jalkanen S, Kalimo H. CD44-Hyaluronate Interaction Mediates In Vitro Lymphocyte Binding to the White Matter of the Central Nervous System: *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology.* Mai 1994;53(3):295–302.
142. Yuan J, Gu K, He J, Sharma S. Preferential up-regulation of osteopontin in primary central nervous system lymphoma does not correlate with putative receptor CD44v6 or CD44H expression. *Human Pathology.* April 2013;44(4):606–11.
143. Lemma SA, Kuusisto M, Haapasaari KM, Sormunen R, Lehtinen T, Klaavuniemi T, u. a. Integrin alpha 10, CD44, PTEN, cadherin-11 and lactoferrin expressions are potential biomarkers for selecting patients in need of central nervous system prophylaxis in diffuse large B-cell lymphoma. *Carcinogenesis.* August 2017;38(8):812–20.
144. He M, Zuo C, Wang J, Liu J, Jiao B, Zheng J, u. a. Prognostic significance of the aggregative perivascular growth pattern of tumor cells in primary central nervous system diffuse large B-cell lymphoma. *Neuro Oncol.* Juni 2013;15(6):727–34.
145. Horstmann WG, Timens W. Lack of adhesion molecules in testicular diffuse centroblastic and immunoblastic B cell lymphomas as a contributory factor in malignant behaviour. *Virchows Arch.* Oktober 1996;429(2–3):83–90.

146. Hasselblom S, Ridell B, Wedel H, Norrby K, Sender Baum M, Ekman T. Testicular lymphoma A Retrospective, Population-based, Clinical and Immunohistochemical Study. *Acta Oncologica*. Dezember 2004;43(8):758–65.
147. Bignami A, Hosley M, Dahl D. Hyaluronic acid and hyaluronic acid-binding proteins in brain extracellular matrix. *Anat Embryol (Berl)*. November 1993;188(5):419–33.
148. Avigdor A, Goichberg P, Shivtiel S, Dar A, Peled A, Samira S, u. a. CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood*. 15. April 2004;103(8):2981–9.
149. Mishima H, Hasebe H. Some observations in the fine structure of age changes of the mouse retinal pigment epithelium. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol*. 8. Dezember 1978;209(1):1–9.
150. Jung J, Seol HS, Chang S. The Generation and Application of Patient-Derived Xenograft Model for Cancer Research. *Cancer Res Treat*. Januar 2018;50(1):1–10.
151. He M, Zhang W, Wang J, Gao L, Jiao L, Wang L, u. a. Aggregative Perivascular Tumor Cell Growth Pattern of Primary Central Nervous System Lymphomas Is Associated with Hypoxia-Related Endoplasmic Reticulum Stress. *J Cancer*. 5. Mai 2021;12(13):3841–52.
152. Liu SH, Gu Y, Pascual B, Yan Z, Hallin M, Zhang C, u. a. A novel CXCR4 antagonist IgG1 antibody (PF-06747143) for the treatment of hematologic malignancies. *Blood Adv*. 21. Juni 2017;1(15):1088–100.

I. Anhang

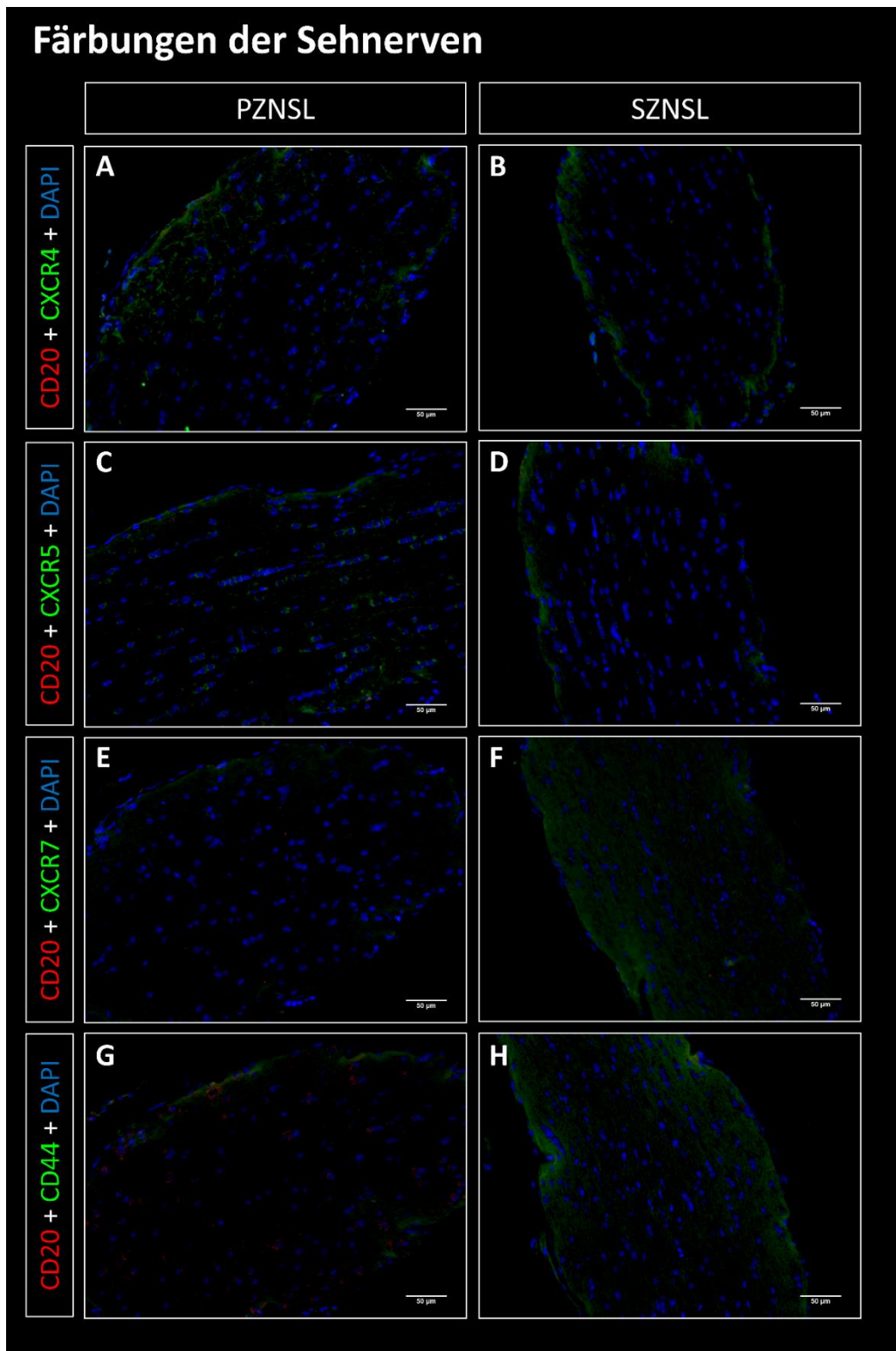
A. Abbildungen des Anhangs

Abb. 23: Positivkontrollen



Hier sind die Positivkontrollen zu sehen, welche auf humaner Tonsille durchgeführt wurden. Bild A zeigt die Doppelfärbung von CD20 und CXCR4, Bild B zeigt die Doppelfärbung von CD20 und CXCR5, Bild C zeigt die Doppelfärbung von CD20 und CD44 und Bild D zeigt die Doppelfärbung von CD20 und CXCR7. Alle Bilder wurden in 200x Vergrößerung aufgenommen. Scale bar 50 µm

Abb. 24: Sehnerven der PZNSL- und SZNSL-Gruppe



Dargestellt sind die Aufnahmen (A-H) der Sehnerven von allen vier Färbungen geordnet nach PZNSL und SZNSL. Vereinzelt lassen sich in der PZNSL-Gruppe positive Zellen nachweisen. Die Gruppen unterscheiden sich nicht in der Expression von den Rezeptoren CXCR4, CXCR5, CXCR7 und CD44, allenfalls waren diese sehr schwach exprimiert. Scale bar 50 μ m

B. Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 27: Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
<	Kleiner
=	Gleich
>	Größer
≤	Kleiner gleich
≥	Größer gleich
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
A.	Arteria (Arterie)
Abb.	Abbildung
ACKR3	Atypical chemokine receptor 3 (Synonym: CXCR7)
AG	Aktiengesellschaft
Akt	Synonym: Protein-Kinase-B
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BALB/c-Maus	Wortverknüpfung aus Bagg (Erstbeschreiber Healsy J. Bagg 1913) und Albino
Bcl	B-Cell lymphoma
BCR	B-Zell Rezeptor
BP	Bandpassfilter
BSA	Bovine Serum Albumine
bzw.	beziehungsweise
C3H/HeN-Maus	Kreuzung aus weiblichen BALB/c- und männlichen DBA-Mäusen
ca.	circa
CD	Cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppen)
Co. KG	Compagnie Kommanditgesellschaft
CSF	Cerebrospinal fluid (Liquor)
CXC	C-X-C-Motif
CXCL	CXC-Ligand

CXCR	CXC-Rezeptor
d.h.	das heißt
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma (diffuses großzelliges B-Zell Lymphom)
DOG	Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft
Dr.	Doktor
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
et al.	et alii / et aliae / et alia (Und andere)
FAG	Fluorescein-Angiographie
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Gramm
GCL	Ganglion cell layer (Ganglienzellschicht)
GIMP	GNU Image Manipulation Program
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HA	Hyaluronic acid (Hyaluronsäure)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
i.s.	Intrasplenisch
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INL	Inner nuclear layer (Innere Körnerschicht)
IRFA4	Interferon Regulatory Factor 4
IRS	Immunreaktiver Score
ISOO	International Society of Ocular Oncology
Ki-67	Kiel-67
L	Liter
M	Molar
M.	Musculus (Muskel)
MEK	Mitogen-activated protein kinase

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	microRNA
ms	Millisekunde
MTX	Methotrexad
MUM1	Multiple Myeloma oncogene 1
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88
n	Number of values (Anzahl aller Werte einer Gruppe)
N.	Nervus (Nerv)
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NK	Natürliche Killerzellen
NOD	Non obesity diabetes
NSG-Maus	NOD/Shi-scid/IL-2Rnull-Mäuse
OCT	okulären Kohärenztomographie
ONL	Outer nuclear layer (Äußere Körnerschicht)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PD	Privatdozent
PDX	Patient-derived xenograft
pH	potentia hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PIOL	Primäre intraokuläre Lymphome
PLC	Phospholipase C
Prof.	Professor
PTL	Primäres testikuläres Lymphom
PTLD	Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder (Posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankung)
PVRL	Primäres vitreoretinales Lymphom
PZNSL	Primäres ZNS-Lymphom
Ras	Rat sarcoma virus (Superfamilie von kleinen G-Proteinen)
RGB	Rot-grün-blau
RHAMM	receptor for hyaluron mediated motility

RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RPE	Retinales Pigmentepithel
s.c.	Subkutan
SCID	Severe combined immunodeficiency (schwerer kombinierter Immundefekt)
si	Silencing
sog.	sogenannt
SZNSL	Sekundäres ZNS-Lymphom
TEM	transendotheliale Migration
TGF- β	Transforming growth factor beta
UCCH	Universitäres Cancer Center Hamburg
UCCSH	Universitäres Cancer Center Schleswig-Holstein
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
USA	United States of America (vereinigte Staaten von Amerika)
USCA	UCCSH Science communication Award
V.	Vena (Vene)
v.a.	Vor allem
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
yDOG	Young DOG
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

C. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die zehn Schichten der Retina.....	2
Abb. 2: Die Einteilung intraokulärer Lymphome	6
Abb. 3: Fundusaufnahme einer Patientin mit PVRL	8
Abb. 4: Die Hypothese des Homings von malignen B-Lymphomzellen.....	13
Abb. 5: Herstellung des PDX-Mausmodells	21
Abb. 6: Das Prinzip der Indirekten Immunfluoreszenzfärbung.....	29
Abb. 7: Schematischer Ablauf der Methodik.....	29
Abb. 8: Beispiel der Darstellung eines Box-Plots	36
Abb. 9: Infiltration der Choroidea der PZNSL-Gruppe	39
Abb. 10: Infiltration der Retina der PZNSL-Gruppe	40
Abb. 11: Doppelfärbung von CD20 und CXCR4.....	41
Abb. 12: Doppelfärbung von CD20 und CXCR5.....	42
Abb. 13: Doppelfärbung von CD20 und CXCR7.....	43
Abb. 14: Doppelfärbung von CD20 und CD44.....	44
Abb. 15: Anteile der ko-exprimierenden Zellen in der Choroidea	45
Abb. 16: Anteile der ko-exprimierenden Zellen in der Retina	46
Abb. 17: Anteile der ko-exprimierenden Zellen im Ziliarkörper	47
Abb. 18: Boxplots – Infiltration der Choroidea	49
Abb. 19: Boxplots – Choroidea.....	51
Abb. 20: Boxplots – Retina.....	53
Abb. 21: Boxplots – Ziliarkörper	55
Abb. 22: Boxplots - Sehnerv.....	57
Abb. 23: Positivkontrollen	87
Abb. 24: Sehnerven der PZNSL- und SZNSL-Gruppe	88

D. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die knöchernen Orbita.....	1
Tabelle 2: Darstellung der Ann-Arbor-Klassifikation	5
Tabelle 3: Mausmodelle für PVRL bzw. PZNSL	15
Tabelle 4: Ort der Expression von Chemokin-Rezeptoren und deren Liganden ..	16
Tabelle 5: Primäre und sekundäre Antikörper	22
Tabelle 6: Chemikalien.....	23
Tabelle 7: Angesetzte Lösungen	24
Tabelle 8: Verbrauchsmaterial.....	25
Tabelle 9: Laborwaren.....	26
Tabelle 10: Laborgeräte	26
Tabelle 11: Für die elektronische Datenverarbeitung genutzte Programme.....	27
Tabelle 12: Liste der genutzten Filter und deren Eigenschaften	33
Tabelle 13: Darstellung der vorgenommenen Einstellungen am Mikroskop.....	33
Tabelle 14: Bildbearbeitung.....	34
Tabelle 15: Immunreaktiver Score.....	35
Tabelle 16: Anzahl der Augenpaare der PZNSL-Gruppe mit und ohne Infiltration	38
Tabelle 17: Gleichartigkeit der Infiltration der Choroidea – deskriptive Statistik ...	48
Tabelle 18: Gleichartigkeit der Infiltration der Choroidea – schließende Statistik .	48
Tabelle 19: Deskriptive Statistik - Choroidea.....	50
Tabelle 20: Schließende Statistik - Choroidea.....	50
Tabelle 21: Deskriptive Statistik - Retina	52
Tabelle 22: Schließende Statistik - Retina.....	52
Tabelle 23: Deskriptive Statistik: Ziliarkörper.....	54
Tabelle 24: Schließende Statistik – Ziliarkörper	54
Tabelle 25: Deskriptive Statistik - Sehnerv	56
Tabelle 26: Schließende Statistik - Sehnerv.....	56
Tabelle 27: Abkürzungsverzeichnis.....	89

II. Ethikvotum



Ethik-Kommission • Engelberger Straße 21 • 79106 Freiburg

Herrn
Prof. Dr. med. Nikolas von Bubnoff
Universitätsklinikum Freiburg
Medizinische Klinik,
Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation
Hugstetter Str. 55
79106 Freiburg

Hauspost

Antrag-Nr. EK-Freiburg: 91/14 (bitte stets angeben)
Projektleiter: Prof. Dr. med. Nikolas von Bubnoff
Universitätsklinikum Freiburg
Medizinische Klinik
Hämatologie, Onkologie und Stammzelltransplantation
Forschungsvorhaben: Xenograft Maus Modell von primären ZNS Lymphomen
[Xenograft mouse model of primary central nervous system
lymphoma]

Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg

Ethik-Kommission

Prof. Dr. S. Pollak
(Vorsitzender)
M. Schmidt
(Komm. Geschäftsführer)

Engelberger Straße 21
79106 Freiburg

Tel. 0761/270-72600 / -72500
Fax 0761/270-72630

www.ethik-kommission.uniklinik-freiburg.de

Bearbeitet von:
Kristina Wehrle
Durchwahl: -72600
kristina.wehrle@uniklinik-freiburg.de

Freiburg, 06. März 2014

VOTUM

Sehr geehrter Herr Professor von Bubnoff,

die Ethik-Kommission hat über Ihren Antrag aufgrund der eingereichten Unterlagen beraten. Die Kommission hat weder ethische noch rechtliche Bedenken gegen die Durchführung der Studie.

Alle Änderungen im Prüfplan müssen der Ethik-Kommission vorgelegt werden und dürfen erst nach der zustimmenden Bewertung umgesetzt werden.

Unabhängig vom Beratungsergebnis macht die Ethik-Kommission darauf aufmerksam, dass die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung einer klinischen Prüfung beim Leiter der klinischen Prüfung und auch bei allen an der Prüfung teilnehmenden Ärzten liegt.

Der Abschluss/Abbruch der Studie ist mitzuteilen und ein Abschlussbericht vorzulegen.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. S. Pollak
Vorsitzender der Ethik-Kommission

III. Tierantrag

Der originale Tierantrag mit dem Aktenzeichen G-17/138 ist ein vertrauliches Dokument von Charles River Laboratories und kann daher nicht zur Verfügung gestellt werden. Nachfolgend ist hier die öffentliche Zusammenfassung des Antrags (NTP) angefügt.

NTP-ID: 00018712-1-8

(Kurz-)Titel bzw. Bezeichnung des Versuchsvorhabens

disseminierte Leukämie-Modelle

Zweck des Versuchsvorhabens

- Translationale und angewandte Forschung

Zu erwartender Nutzen des Versuchsvorhabens

Weltweit werden nach WHO-Angaben ca. 14. Mio. neu an Krebs erkrankte Menschen mit steigender Tendenz mit bis zu 20 Mio. im Jahr 2025 erwartet [World Cancer Report 2014]. Jährlich erkranken allein in der Bundesrepublik Deutschland ca. 500.000 Menschen, im Jahr 2010 sind 218.258 Menschen an Krebs verstorben. Dem gegenüber stehen in Deutschland jährlich ca. 21.000 Patienten, die mit einer medikamentösen Therapie geheilt werden können. Diese Verhältnisse stellen sich in nahezu allen Industrienationen der Welt ähnlich dar. Die medikamentöse Behandlungsform ist als solche neben Operation und Bestrahlung also zwar bewährt, aber die Situation bei der Krebsbehandlung ist nach wie vor unbefriedigend und somit die Entwicklung neuer Substanzen und Therapiekonzepte zur Behandlung von Tumorerkrankungen nach wie vor unerlässlich. Pharma- und Biotechnologieunternehmen arbeiten daher seit Jahrzehnten unvermindert an der Entwicklung neuer medikamentöser Therapieideen gegen Tumorerkrankungen. Im Rahmen dieses beantragten Versuchsvorhabens sollen in Mäuse eingebrachte humane Leukämien mit Testsubstanzen behandelt und so die Wirksamkeit anhand verschiedener Parameter von Tumorerkrankungen untersucht werden. Darüber hinaus sollen im Rahmen dieser Versuche Proben gewonnen werden, die der Untersuchung z.B. des Wirkmechanismus und/oder der Verstoffwechslung der Substanzen dienen.

Schäden

Es wird ein mittlerer Schweregrad des Versuchsvorhabens erwartet. Schwere Belastungen werden durch Anwendung versuchsspezifischer Abbruchkriterien und engmaschiger Betreuung der Tiere verhindert. Geringe Belastungen treten durch eine Kurzzeit-Isofluran-Narkose zur Tumorzellinjektion ins Knochenmark der Tibia auf. Mittlere Belastungen treten auf durch die wiederholte Gabe von Testsubstanzen über einen andauernden Zeitraum bzw. deren möglicher Nebenwirkungen. Die Krebstherapien stellen, wie beim Menschen, eine Belastung mit unterschiedlichen Auswirkungen dar (z.B. Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Durchfall). Auch die Blutabnahme und eine Operation zur Tumorzellinjektion in die Milz können eine mittlere Belastung darstellen. Die Tiere werden am Ende schmerzfrei getötet.

Tiere

Tierart	Tierzahl	Freiwillige Ergänzungen
---------	----------	----------------------------

1 von 2

Mäuse	10875	
-------	-------	--

Anwendung der 3R

Replacement/Vermeidung

Trotz intensiver Suche nach alternativen Testsystemen gilt das vom Patienten gewonnene Tumormaterial, abstoßungsfrei kultiviert im Labornager, nach wie vor und bis auf weiteres als Goldstandard der präklinischen onkologischen Testsysteme. Die Richtlinien der Zulassungsbehörden setzen eine nachvollziehbare Dokumentation der präklinischen Wirksamkeit von neu zuzulassenden Tumortheraeutika im Nagermodell voraus. Daher ist es unerlässlich, dafür Versuchstiere zu verwenden.

Reduction/Verminderung

Die geschätzte Anzahl der Tiere basiert auf unseren derzeitigen Erfahrungen auf diesem Gebiet. Es werden so wenige Tiere wie möglich verwendet, um ein statistisch gesichertes Ergebnis zu erhalten. Es werden unterschiedliche Auswerteparameter bemüht, um aus dem Versuch maximalen Erkenntnisgewinn zu erzielen.

Refinement/Verbesserung

Die Tiere leben in Gruppen und werden mit Einstreu, Nistmaterial sowie Futter und Wasser versorgt. Die Behandlung mit Medikamenten belastet die Tiere. Die Dosierungen werden so gewählt, dass diese Belastungen unter Beachtung des Untersuchungszieles so gering wie möglich sind.

2 von 2

IV. Danksagung

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Vinodh Kakkassery für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung herzlich danken. Ich erhielt während zahlreicher Gespräche viel Unterstützung und auch konstruktive Kritik, die mich in wissenschaftlicher aber auch in persönlicher Hinsicht prägten. Besonders dankbar bin ich für die wissenschaftliche Förderung und Ihre Ermutigungen, meine Arbeit auf verschiedenen Kongressen vorzustellen.

Ich danke des Weiteren Herrn Prof. Nikolas von Bubnoff. Durch die geschätzte Kooperation mit ihm und seiner Arbeitsgruppe in Freiburg erhielten wir die Materialien und Expertise, auf denen dieses Projekt beruht.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Salvatore Grisanti, der als Direktor der Augenklinik am UKSH Lübeck den Kontakt zu Herrn Kakkassery herstellte und mich ermutigte, dort nach einem Thema zu fragen. Zudem erhielt ich durch ihn die Möglichkeit, diese Arbeit durchzuführen.

Frau Dr. Lisa Isbell gilt ebenfalls besonderer Dank. Sie schickte uns nicht nur die Mausaugen der Homing-Modelle nach Lübeck und ließ uns viele Informationen zukommen, sondern betreute mich auch während eines kurzen Praktikums vor Ort in Freiburg unter großem persönlichem Aufwand.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Frau Christine Örün und Frau Aysegül Tura für die tatkräftige Unterstützung im Labor. Ich konnte jederzeit mit Fragen und Problemen zu ihnen kommen und erhielt immer Hilfe von ihnen.

Besonders bedanken möchte ich mich zudem bei der young Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (yDOG), die mich für ein Doktorandenstipendium ausgewählt haben. Dadurch hatte ich nicht nur die Möglichkeit, finanziell unabhängig an meiner Dissertation zu arbeiten, sondern durfte auch meine Ergebnisse auf dem Kongress der DOG 2022 vorstellen.

Außerdem möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen beiden liebsten Kommilitoninnen Luise Klapper und Johanna Schwandt bedanken. Sie standen mir immer – auch zu unmöglichen Tageszeiten – mit Rat und Tat zur Seite.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Freund und Partner Paul Werner Kunth für die kritische Durchsicht und die ergiebigen Diskussionen über meine Doktorarbeit bedanken. Großer Dank gilt auch meinen Eltern Anja und Jan-Peter Babst sowie meinem Bruder Theige Babst. Sie alle waren mir während dieser Zeit und darüber hinaus eine große emotionale Stütze.