

Abteilung Innere Medizin I
Leiter: Prof. Dr. med. G. Adler
Universität Ulm

**Bedeutung von KH-domain containing protein overexpressed in cancer
(KOC) als Marker zur Diagnostik einer Manifestation von malignen
Erkrankungen im ZNS**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Andreas Burger
Tett nang

2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Seufferlein

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Griesshammer

Tag der Promotion: 13.12.2007

Diese Arbeit ist meinem Vater Josef Burger gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen.....	5
1. Einleitung	6
2. Materialien und Methoden	14
2.1 Herkunft und Gewinnung der untersuchten Zellen	14
2.1.1 Herkunft der Proben	14
2.1.2 Entnahmetechnik für Liquor	14
2.2 Bestimmung der KOC Expression in Zellen aus der Lumbalpunktion.....	14
2.3 Zytologische Untersuchung der gewonnenen Lumbalpunktionen.....	15
2.4 Auswahl der Patienten.....	16
2.5 Statistik.....	17
3. Ergebnisse	18
3.1 Reaktive Veränderungen	19
3.2 Myeloische Leukämien	21
3.3. Akute lymphatische Leukämie und lymphatische Blastenschübe bei CML, maligne und indolente Non-Hodgkin-Lymphome, M. Hodgkin.....	22
3.4. Solide Tumore	24
4. Diskussion	27
5. Zusammenfassung	31
6. Literaturverzeichnis.....	33
7. Danksagung	39

Verwendete Abkürzungen

AILD	angio-immunoblastic lymphoid disorder
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ATCL	Adulte T-Zell-Leukämie
B-CLL	B-Chronische lymphatische Leukämie
BCR-ABL	break point cluster region ABL
B-NHL	B-Non-Hodgkin Lymphom
C-ALL	common acute lymphoblastic leukemia
Ca.	Carcinom
CD 27	cluster of differentiation 27
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CT	Computertomographie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FAB	French-American-British-Group
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GI-Tumor	Gastrointestinaler Tumor
IgG, IgM	Immunglobulin Typ G, Typ M
KOC	KH-domain containing protein overexpressed in cancer
LDH	Laktatdehydrogenase
M. Crohn	Morbus Crohn
MALT	mucosa associated lymphatic tissue
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NOS	Not otherwise specified
NK-Zell-Lymphom	Natürliche Killerzellen Lymphom
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PLL	Pro-Lymphozyten-Leukämie
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
Staph. aureus	Staphylokokkus aureus
TAE	tris acid edta-puffer
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem
Zyto	Zytologie

1. Einleitung

Eine korrekte und möglichst vollständige Ausbreitungsdiagnostik maligner Erkrankungen (Staging) ist die Basis prognostischer Aussagen und essentiell für eine stadiengerechte Behandlung. Bildgebende Verfahren spielen hierfür in den letzten Jahrzehnten die entscheidende Rolle und haben insbesondere in der Lymphomdiagnostik invasive Massnahmen wie die explorative Laparotomie und Splenektomie zum Staging maligner Lymphome abgelöst.

Die zunehmende Verfügbarkeit funktioneller Verfahren wie der Positronen-Emissionstomographie (PET) hat die Sensitivität und Spezifität des Stagings weiter verbessert [23, 24]. Trotz dieser Fortschritte ist es bislang nicht gelungen, eine Ausbreitung maligner Erkrankungen im Zentralen Nervensystem (ZNS) mit hinreichender Zuverlässigkeit zu diagnostizieren. Besondere Bedeutung hat der Befall des ZNS bei malignen hämopoetischen Erkrankungen, die das Kompartiment des ZNS als „Rückzugsraum“ nutzen: Konventionelle therapeutische Maßnahmen sind häufig nicht in der Lage, den „Dritten Raum“ des ZNS zu erreichen. Von dort aus kommt es zur Repopulation des eigentlich tumorfreien Organismus. Nur intensivierete Therapiemaßnahmen wie die intrathekale Applikation von Zytostatika, ZNS-Bestrahlung oder die höchstdosierte Anwendung von wenigstens zum Teil liquorgängigen Substanzen vermag dieses Problem teilweise zu lösen, häufig um den Preis erheblicher Toxizität. Besonders oft wird der ZNS-Befall bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL), der akuten myeloischen Leukämie (AML), sowie im akuten Blastenschub einer chronisch myeloischen Leukämie (CML) beobachtet [40]. Er ist aber auch bei den Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) und sehr selten beim Hodgkin Lymphom beschrieben worden [2, 4, 11, 18, 29]. Eine ZNS Beteiligung bei Diagnosestellung wird bei fünf bis sieben Prozent der AML Patienten [6] und in bis zu zehn Prozent der Patienten mit einer adulten ALL festgestellt [10]. Die Inzidenz für das Auftreten eines Befall des ZNS bei NHL Patienten ist häufig und kann, abhängig vom histopathologischen Subtyp, bis zu 30 % erreichen [2, 11, 18, 29]. Isolierte ZNS-Lymphome sind eine seltene, schwierig zu diagnostizierende und zu therapierende Entität.

Seltener ist die Beteiligung des ZNS bei soliden Tumoren, wobei hier vor allem das Mammacarcinom, das kolorektale Karzinom und das Maligne Melanom [19, 36] Erwähnung finden sollten.

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der malignen Lymphome [14]

B-Zell-Lymphome	NK/T-Zell-Lymphome
<ul style="list-style-type: none"> •ALL •CLL •PLL •Splenisches Marginalzonen-L. •Haarzell-Leukämie <li style="padding-left: 20px;">Plasmazellerkrankungen <li style="padding-left: 40px;">•Multiples Myelom <li style="padding-left: 40px;">•Plasmozytom <li style="padding-left: 40px;">•Primäre Amyloidose <li style="padding-left: 40px;">•Schwerkettenkrankheit •MALT-Lymphom •Marginalzonenlymphom nodal •Folliculäres Lymphom •Diffus großzelliges Lymphom •Mediastinales Lymphom •Intravaskuläres Lymphom •Primary effusion lymphoma •Burkitt Lymphom •Post-Transplantations-Lymphom 	<ul style="list-style-type: none"> •ALL •CLL •PLL •NK-Zell-Lymphom •ATCL <li style="padding-left: 20px;">Kutane Lymphome <li style="padding-left: 40px;">•Mycosis fungoides <li style="padding-left: 40px;">•Sezary Syndrome <li style="padding-left: 40px;">•Primär kutan anaplastisches L. <li style="padding-left: 20px;">Extranodale Lymphome <li style="padding-left: 40px;">•Nasales T-Zell-Lymphom <li style="padding-left: 40px;">•Enteropathie assoziiertes Lymphom <li style="padding-left: 40px;">•Hepatosplenisches Lymphom <li style="padding-left: 40px;">•Subcutanes, panniculitis-like T-Zell-L. <li style="padding-left: 20px;">Nodale Lymphome <li style="padding-left: 40px;">•AILD <li style="padding-left: 40px;">•Peripheres T-Zell-Lymphom <li style="padding-left: 40px;">•Anaplastisches T-Zell-Lymphom <li style="padding-left: 40px;">•Blastäres NK-Zell-Lymphom
Morbus Hodgkin	
Nodulär Lymphozyten prädominant	Klassischer Hodgkin

(ALL= Akute lymphatische Leukämie, CLL= Chronische lymphatische Leukämie, PLL= Pro-Lymphozyten Leukämie, NK-Zell-Lymphom= Natürliche Killerzellen Lymphom, ATCL= Adulte T-Zell-Leukämie, MALT= mucosa associated lymphoid tissue = schleimhautassoziiertes lymphatisches Gewebe, AILD= angio-immunoblastic lymphoid disorder, L.= Lymphom)

Standardverfahren für die Diagnose eines ZNS – Befalls sind neben den bildgebenden Verfahren wie Kernspintomographie (MRT) [5, 16, 21, 34] und Computertomographie (CT) [28, 35] morphologische und laborchemische Untersuchungen des Liquors. Da eine ZNS-Mitbeteiligung anfangs asymptomatisch bleiben kann, wird eine Lumbalpunktion mit einer zytologischen Untersuchung des Liquors als initiale Stagingprozedur bei hämatologischen Patienten empfohlen [2, 10]. Trotz dieser Maßnahmen wird ein Teil der Patienten nicht adäquat diagnostiziert. Besonders bei indolenten lymphoproliferativen Erkrankungen kann die zytologische Differenzierung zwischen Tumorzellen und reaktiven Lymphozyten, wie sie zum Beispiel bei einer viralen Meningitis vorkommen können, schwierig sein. Ähnlich wie bei den soliden Tumoren kann die erste zytologische Untersuchung des Liquors in bis zu 40 % der Patienten mit einem Liquorbefall durch ein Non-Hodgkin-Lymphom ein falsch negatives Ergebnis liefern [3, 30, 42]. Auch bei einer Wiederholung der Untersuchung des Liquors kann bei Patienten mit einem meningealen Befall in fünf bis zehn Prozent der Fälle keine definitive Diagnose gestellt werden. Falsch negative Ergebnisse sind nicht nur auf untersucherabhängige Faktoren zurückzuführen. Häufige Fehler entstehen durch zu wenig Material, zu lange Lagerung der Probe oder zu geringe Tumorlast [9]. Für eine präzisere Diagnose sind deswegen zusätzliche Methoden zur besseren Unterscheidung zwischen malignen lymphatischen Zellen und reaktiven Zellen notwendig.

Die Spezifität der Liquorzytologie ist sehr gut. Falsch positive Ergebnisse kommen bei der Untersuchung durch erfahrene Zytopathologen selten vor [38]. Allerdings kann es vor allem bei der Beurteilung einer Liquorprobe von Patienten mit schwerer Grunderkrankung und unspezifischer Mitreaktion des Liquorraumes im Rahmen eines generalisierten Infektes zu einer Fehlinterpretation kommen.

In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, um die Tumordiagnostik aus Liquor zu verbessern. Eine Möglichkeit bietet die Immunzytologische Analyse mit monoklonalen Antikörpern gegen Oberflächen-Antigene der interessierenden Tumorzellen. Diese Methode ist häufig durch die niedrige Zellzahl im Liquor eingeschränkt, von geringer Sensitivität und trägt nur wenig zur standardmäßigen morphologischen Begutachtung bei [12]. So stellen zum Beispiel Hovestadt et al. [12] bei ihren immunzytologischen Analysen von Patienten mit soliden Tumoren oder malignen hämatologischen Erkrankungen eine Sensitivität von 54 %, aber eine Spezifität von 98 % bei

Verwendung der Immunzytologie fest. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, dass die Immunzytologie nicht als Screening-Verfahren eingesetzt werden sollte. Der diagnostische Gewinn immunzytologischer Verfahren im Vergleich zur reinen Morphologie beträgt acht bis zwölf Prozentpunkte [1, 12]. Verbessert werden kann dieses Ergebnis zum Beispiel mittels einer Immunphänotypisierung durch die Multiparameter Flow Zytometrie (FACS) [8, 31]. Dabei werden nicht nur mehr Zellen untersucht, sondern es können auch erheblich mehr verschiedene Epitope mittels verschiedener Antikörper getestet werden. Vor Allem aber können Mehrfachmarkierungen Ko-Expressionen bestimmter Epitope nachweisen, die charakteristisch für bestimmte Malignome sind.

Obwohl verschiedene humorale Tumormarker im Liquor auftauchen, ist ihr Einsatz im klinischen Alltag zur Diagnosestellung einer malignen Infiltration des Liquors nicht etabliert. Verschiedene lösliche Serummarker wie zum Beispiel Albumin, IgG, IgM, Fibronectin, β 2-Mikroglobulin, Tumornekrosefaktor (TNF)- α und oligoklonale Immunglobulin-Banden wurden bei Leukämie- und Lymphompatienten im Liquor bestimmt. Trotz der Tatsache dass eine Reihe von Veränderungen entdeckt wurden, konnte kein zuverlässiger Parameter zur Diagnose eines Liquorbefalls gefunden werden [39]. Dies erscheint nicht verwunderlich, da alle erwähnten Parameter auch Produkte der physiologischen Reaktion des Immunsystems sind und somit auch bei entzündlichen Veränderungen häufig vorkommen.

Neben diesen aufgeführten Markern wurden bei soliden Tumoren eine Reihe weiterer Tumormarker im Liquor untersucht. So wurde zum Beispiel geprüft, ob die Bestimmung der D-Dimere (Fibrinolyseprodukt) als Marker dienen kann, um einen meningealen Befall anzuzeigen. Obgleich dieser Test für bestimmte Neoplasien nicht spezifisch ist, zeigten diese Daten, dass die Bestimmung der D-Dimere in der Diagnosestellung bei einem ZNS-Befall und in der Therapieüberwachung nützlich sein kann. Allerdings sind die D-Dimere auch nach traumatischer Lumbalpunktion mit subklinischer Blutung erhöht, so dass sie sich nicht als Parameter zur Verlaufskontrolle bei häufig punktierten Patienten eignen [7]. Die Kombination aus einem unspezifischen Tumormarker, wie zum Beispiel des LDH Isoenzym 5 und der zytologischen Begutachtung kann die Diagnostik verbessern, bietet aber letztlich keine hinreichende Sicherheit [22].

Eine Vielzahl weiterer Tumormarker ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Viele dieser Marker (z. B. Fibronectin [17], TNF- α [13], lösliches CD 27 [15]) scheinen viel versprechend zu sein, benötigen jedoch zur Validierung weitergehende Untersuchungen, um sich im klinischen Gebrauch durchsetzen zu können.

Eine weitere Möglichkeit der molekularbiologischen Identifizierung von malignen Zellen bietet die Diagnostik auf der Ebene der DNA bzw. der RNA. Hierbei bedient man sich der Polymerase Kettenreaktion (PCR) oder der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) [21, 33]. Grundlage hierfür ist die Kenntnis spezifischer genetischer Veränderungen innerhalb einer Tumorzellpopulation. Insbesondere maligne Lymphome und Leukämien zeichnen sich durch das Vorhandensein spezifischer genetischer Aberrationen aus (Tabelle 2). So weist eine Unterform der ALL (Common ALL) häufig eine Chromosomentranslokation t (9;22) mit dem Fusionsgen BCR-ABL auf. Bei der AML findet man häufig eine Inversion auf Chromosom 16 mit dem Fusionsgen CBF β MYH11, eine Translokation t (15;17) oder t (8;21). Mittels sehr sensitiver Methoden wie der PCR gelingt der Nachweis geringster Mengen DNA als Indikator für residuellen Befall. Problematisch ist jedoch, dass nicht zwischen autochthonen Zellen des Liquors und kontaminierenden Zellen aus dem Blut unterschieden werden kann. Die Komplexität der verschiedenen Chromosomenaberrationen, welche den unterschiedlichen Leukämien beziehungsweise Lymphomen, aber auch soliden Tumoren zugrunde liegen können, macht es beinahe unmöglich mittels dieser Verfahren ein Screening durchzuführen. In einer Liquorprobe können nicht alle theoretisch möglichen Veränderungen untersucht werden. Zudem stellt sich das Problem, dass immer noch mehr als 70% aller Malignome nicht über bekannte Aberrationen verfügen. Außerdem sind die Untersuchungsmethoden teuer und aufwändig [37].

Tabelle 2: Distinkte Aberrationen hämatologischer Neoplasien [14]

Aberration	Krankheitsbild	Involvierte Gene
t(14;18)(q32;q21)	Follikuläres NHL Diffus großzellig	BCL-2, Igh
t(8;14)(q24;q32)	Burkitt-Lymphom	c-myc, Igh
t(8;22)(q24;q11)	Burkitt-Lymphom	c-myc, Igl
t(2;8)(p11;q24)	Burkitt-Lymphom	c-myc, Igk
t(11;14)(q13;q32)	Mantelzell-Lymphom B-CLL	Cyclin D1
t(11;18)(q21;q21)	Marginalzonen-Lymphom/MALT	API1, MALT1
t(14;18)(q32;q21)	Marginalzonen-Lymphom/MALT	MALT, Igh
t(1;14)(q21;q22)	Marginalzonen-Lymphom/MALT	BCL-10; Igh
t(1;2)(q22;p12)	Marginalzonen-Lymphom/MALT	BCL-10, Igk
t(2;18)(p11;q21)	B-CLL	BCL-2, Igk
t(18;22)(q21;q11)	B-CLL	BCL-2, Igl
t(14;19)(q32;q13)	B-CLL	BCK-3, IGH
t(9;14)(p13;q32)	lymphoplasmocytisches Lymphom	Igh
t(3;14)(q27;q32)	de novo diffus großzellig	Igh
t(3;22)(q27;q11)	de novo diffus großzellig	Igl
t(3;2)(p12;q27)	de novo diffus großzellig	Igk
t(15;17)	Promyelozytenleukämie	Retinsäurerezeptor
t(8;21)	Akute myeloische Leukämie	
Inv (16)	Akute myeloische Leukämie	CBF
t(9;22)	CML, C-ALL	BCR-ABL
t(2;5)	großzellig anaplastisches Lymphom	ALK, NPM

[t= Translokation, in Klammer entsprechend die beteiligten Chromosomen und der Genort, bezeichnet mit p (kurzer Arm des Chromosoms) und q (langer Arm des Chromosoms); Inv= Inversion, NHL= Non-Hodgkin-Lymphom, BCL-2= B-cell lymphoma 2 associated oncogene, Igh= Immunglobulin-heavy-locus, c-myc= c-myelocytomatosis oncogene, Igl= Immunglobulin-lambda chain complex, Igk= Immunglobulin-kappa locus, B-CLL= Chronisch-lymphatische-B-Zell-Leukämie, API 1= alpha-2-antiplasmin 1, MALT 1= mucosa associated lymphatic tissue lymphoma translocation gene 1, BCK= brain-type creatin kinase, CBF= cytosinmonophosphat binding factor, BCR= breakpoint cluster region, ABL= Abelson tyrosin kinase, ALK= anaplastic lymphoma kinase, NPM= nucleophosmin, CML= Chronisch myeloische Leukämie, C-ALL= common acute lymphoblastic leukemia]

Ein ideales Verfahren zum Nachweis maligner Zellen im Liquor sollte folgende Eigenschaften besitzen:

- anwendbar bei möglichst vielen Malignomen
- einfache Durchführbarkeit des Tests
- zumindest semiquantitative Aussage möglich (Verlaufskontrolle)
- hohe Spezifität zur Abgrenzung von reaktiven Befunden

KOC als neuer Marker für Malignität

1997 hat die Arbeitsgruppe von Mueller-Pillasch et al. in einer weit angelegten Untersuchung für unterschiedliche exprimierte Genprodukte in Pankreaskarzinomzellen ein Gen identifiziert, welches ein neuartiges Protein mit vier K-homologen (KH) Domänen kodiert. Dieses KOC genannte Gen (KH-domain containing protein overexpressed in cancer) ist im Pankreaskarzinom überexprimiert und in entzündlichem oder normalem Zellgut nicht nachweisbar [25-27, 41]. Eine bekannte Funktion von Proteinen, die eine KH-Domäne enthalten, ist die Regulation der mRNA. Damit kommt ihnen eine Bedeutung bei fundamentalen biologischen Prozessen wie der Zellentwicklung, Zellwachstum, Zelldifferenzierung und in der Karzinogenese zu [32]. So ließ sich die KOC-Expression schon in frühen Schwangerschaftsstadien in Mäuseembryonen nachweisen. In der späten Schwangerschaft ließen sich die höchsten Konzentrationen für KOC im Magen, Pankreas, Niere und dem sich entwickelnden Gehirn nachweisen [26]. KOC ist damit ein oncofetales Gen. Es könnte eine Rolle in der Regulation der Tumorzellproliferation spielen, indem es bei der Transkription und/ oder bei posttranskriptionellen Prozessen interferiert. Die genaue Rolle von KOC in der Tumorbiologie ist noch unklar.

Das vorliegende Datenmaterial legt den Schluss nahe, dass KOC insbesondere in malignen Tumoren und im embryonalen Gewebe exprimiert wird [25, 26] und deswegen ein ideales Ziel zur Diskrimination maligner und benigner Prozesse bei adulten Organismen darstellt.

So erwies sich die KOC in einer prospektiven Untersuchung von Mueller et al. bei 76 Patienten, die einer Feinnadelpunktion für die weitere Diagnostik einer abdominellen Raumforderung von Aszites, Zysten oder Liquor cerebrospinalis unterzogen wurden, als probater Marker für Malignität [27].

Neben der Möglichkeit des Nachweises mittels RT-PCR auf RNA-Ebene gibt es mittlerweile einen monoklonalen Antikörper, der sich zur immunhistochemischen Analyse eignet [41].

Eigene, nicht publizierte Voruntersuchungen an hämatopoetischem Zellmaterial lieferten gute Ausgangsdaten für die Anwendung dieser Untersuchungsmethode für die Diagnostik von Leukämien und Lymphomen. Aufgrund dieser Daten sollte diese vorliegende Untersuchung folgende Fragen klären:

1. Lassen sich Liquorproben mittels RT-PCR auf das Vorhandensein KOC-exprimierender Zellen hin untersuchen?
2. Welche Erkrankungen eignen sich zur Untersuchung mittels KOC?
3. Korrelieren die Ergebnisse der KOC-Diagnostik mit den zytologischen Daten ?

2. Materialien und Methoden

2.1 Herkunft und Gewinnung der untersuchten Zellen

2.1.1 Herkunft der Proben

Alle in dieser Arbeit verwendeten Liquorproben wurden von Patienten der Universität Ulm, Abteilung Innere Medizin III, mit deren ausdrücklichem Einverständnis gewonnen. Die Entnahmen fanden im Rahmen der aus klinischer Indikation notwendigen Kontrolluntersuchungen statt. In der Mehrzahl handelte es sich um stationäre Patienten.

2.1.2 Entnahmetechnik für Liquor

Von jedem Patienten wurde zu diagnostischen Zwecken Liquor cerebrospinalis mittels einer Lumbalpunktion mit einer sterilen Einwegkanüle mit Mandrin 8 (22 G x 90mm) unter aseptischen Bedingungen gewonnen. Die ersten fünf Tropfen wurden verworfen und der Liquor in sterilen Plastikröhrchen gesammelt und zügig weiterverarbeitet. Die Liquormenge lag bei 0,5 bis 3 ml. Ein Aliquot von ca. 400 µl wurde für die Zytologie verwendet.

2.2 Bestimmung der KOC Expression in Zellen aus der Lumbalpunktion

1×10^6 Zellen (bei geringer Zellzahl im Liquor entsprechend weniger) wurden mit 1ml humanem Serum gemischt und unmittelbar danach bei 1200 Umdrehungen pro Minute für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die zurückgebliebenen Zellpellets in RNeasy Mini Kit Lysepuffer (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) resuspendiert und die Gesamt-RNA unter Verwendung des gleichen Kit nach der Anweisung des Herstellers extrahiert. Die cDNA Synthese und die Polymerase Kettenreaktion wurden mit dem „One Step PCR Kit“ (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) unter Verwendung von KOC Genspezifischen Primern durchgeführt. Die Annealingtemperatur betrug 55°C für 32 Zyklen. Die PCR Produkte wurden auf einem 1%igen Agarose/ TAE Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

Die KOC RT-PCR Assays wurden Einfachblind und von verschiedenen Mitarbeitern unabhängig voneinander durchgeführt.

2.3 Zytologische Untersuchung der gewonnenen Lumbalpunktionen

Für die Zellzählung wurde eine Zählkammer nach Neubauer verwendet. 20 µl Liquor wurden mit 2 ml Hämolyse-reagenz vermischt (Verdünnungsfaktor 1:100). Nach dem Auflegen des Deckglases auf die Zählkammer wurde diese langsam mit der verdünnten Probe gefüllt, bis der Überschuss in die Überlaufrinne floss. Um Verdunstung zu vermeiden wurde die Zählkammer in eine feuchte Kammer gelegt. Mit dem 40fachen Objektiv wurde die Zellzahl (n) in fünf Gruppenquadranten, bestehend aus je 4x4 Kleinstquadranten, ausgezählt. Für die Zählung wurden alle Zellen verwertet, die innerhalb der mittleren der drei Begrenzungslinien der Gruppenquadrate lagen, sowie die Zellen, die die mittlere Linie von zwei Seiten berührten, zum Beispiel am linken und unteren Rand des Gruppenquadrats, also L-förmig.

Fünf Gruppenquadrate ergeben ein Volumen von 0,02 µl. Multipliziert man die Zellzahl mit 50, ergibt sich die Anzahl der Zellen pro µl Liquor.

Die Aufrundung der Zellzahlen auf ganze Zahlen gewährleistet eine bessere Übersichtlichkeit bei der Auswertung. Unter Berücksichtigung aller zur Verfügung stehenden klinischen Informationen führte ein zytologisch erfahrener Arzt die Auswertung des Untersuchungsgutes durch. Insbesondere wurde der Anteil der unterschiedlichen Zellsubgruppen (Granulozyten, Lymphozyten, Blasten) differenziert. Der abschließende Befund wurde in die Kategorien reaktiv, entzündlich-granulozytär, maligne epithelial, maligne lymphatisch, maligne myeloisch oder nicht diagnostisch eingeordnet.

Die Auswertung bezieht sich auf die jeweils zum Punktionszeitpunkt klinisch verwertete Interpretation der Liquorzytologie. In Fällen mit diskrepanten Befunden wurden die Präparate nochmals mikroskopiert.

2.4 Auswahl der Patienten

Alle im Untersuchungszeitraum gewonnenen Liquorproben wurden neben einer zytologischen Untersuchung auch einer KOC Bestimmung unterzogen. Insgesamt standen 62 Patienten für die Untersuchung zur Verfügung.

Von den insgesamt 62 Patienten konnten 43 für die Auswertung verwendet werden. Voraussetzung für den Einschluss in die Untersuchung war ein eindeutiger zytologischer Befund kombiniert mit einer eindeutigen KOC-Analyse. 19 Patienten wurden von der Auswertung ausgenommen. Gründe waren ein nicht eindeutiger zytologischer Befund bedingt durch Blutkontamination, eingeschränkte, beziehungsweise unzureichende Beurteilbarkeit des Präparates bei schlechter Erhaltung des Probenmaterials oder retrospektiv nicht auffindbare Liquorbefunde, sowie eine nicht eindeutige KOC-Analyse des Punktats als fraglich positiv beziehungsweise fraglich negativ oder fehlend.

Bei den in die Studie aufgenommenen 43 Patienten wurde aus medizinischen Gründen oder bedingt durch unzureichende Beurteilbarkeit des gewonnenen Materials (Blutkontamination, zu geringe Probenmenge, schlechte Erhaltung des Materials) eine zweite (18 Patienten) oder mehrere (sechs bzw. fünf Patienten) Lumbalpunktionen durchgeführt. Somit konnte auf insgesamt 71 untersuchte Probenpaare zurückgegriffen werden.

Die Zuteilung zu einer jeweiligen Gruppe erfolgte anhand der Primärdiagnose des Patienten.

2.5 Statistik

Wegen der teilweise geringen Fallzahl werden die Ergebnisse in erster Linie deskriptiv dargestellt. Einige wichtige statistische Parameter für das gesamte Patientenkollektiv wurden anhand folgender Formeln berechnet. Innerhalb der Subgruppen wurde darauf wegen der geringen Fallzahlen verzichtet.

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl der richtig Positiven}}{\text{Anzahl der richtig Positiven} + \text{Anzahl der falsch Negativen}}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl der richtig Negativen}}{\text{Anzahl der richtig Negativen} + \text{Anzahl der falsch Positiven}}$$

$$\text{Positiv prädiktiver Wert} = \frac{\text{Anzahl der richtig Positiven}}{\text{Anzahl der richtig Positiven} + \text{Anzahl der falsch Positiven}}$$

$$\text{Negativ prädiktiver Wert} = \frac{\text{Anzahl der richtig Negativen}}{\text{Anzahl der richtig Negativen} + \text{Anzahl der falsch Negativen}}$$

3. Ergebnisse

Insgesamt wurden 71 Liquorproben von 43 Patienten untersucht. Je nach Hauptdiagnose wurden 4 Gruppen gebildet:

- Reaktive Veränderungen – diese Gruppe enthielt alle entzündlichen Veränderungen und umfasste 6 Patienten
- Maligne myeloische Leukämien – unter dieser Entität wurden 11 Patienten mit bereits diagnostizierter myeloischer Leukämie (AML sowie CML in chronischer Phase) subsummiert
- Maligne lymphatische Erkrankungen – diese Gruppe umfasste alle lymphatischen Leukämien - auch eine CML im lymphatischen Blastenschub und Lymphome, insgesamt 23 Patienten
- Solide Tumoren – hier wurden 3 Patienten mit nicht hämopoetischen malignen Erkrankungen eingeschlossen

Vorausgesetzt die zytologische Untersuchung wird als Standard zur Beurteilung maligne versus benigne herangezogen, hat die KOC-Diagnostik am Gesamtkollektiv eine Sensitivität von 60%, eine Spezifität von 94% sowie einen positiven prädiktiven Wert von 75% bei einem negativen prädiktiven Wert von 89%. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist in Tabelle 7 dargestellt.

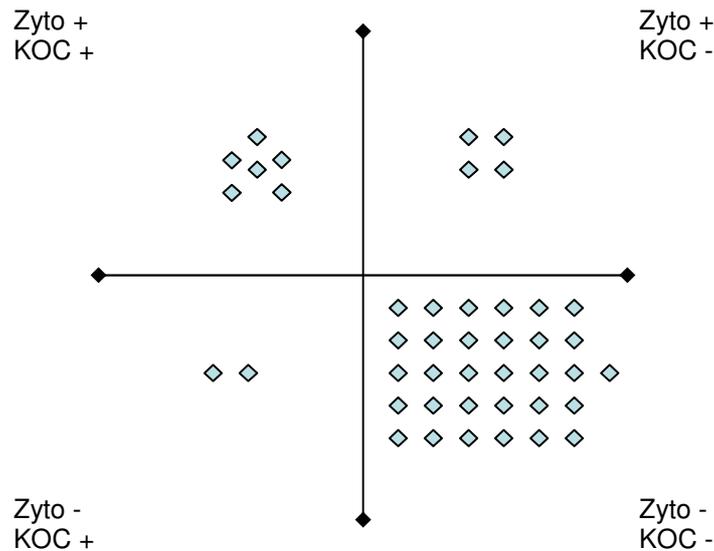


ABBILDUNG 1: ALLE PATIENTEN, 1. LIQUORPROBE, 43 MESSUNGEN
 (Zyto= Zytologie, KOC= KH-domain containing protein overexpressed in cancer)

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Auswertung bezogen auf die Diagnosegruppen dargestellt.

3.1 Reaktive Veränderungen

Sechs Patienten (fünf Männer und eine Frau, Altersmittelwert 54 Jahre, Range 32 bis 70 Jahre) wurden der Gruppe der entzündlichen/ reaktiven Veränderungen im Liquor zugeordnet. Die klinischen Diagnosen der Patienten waren CMV-Meningoenzephalitis, Pneumonie, Pankreatitis, Sepsis bei Zustand nach akuter Aortendissektion Typ A mit Aorta ascendens-Ersatz, M. Crohn und Staphylococcus aureus Meningitis. Bei allen sechs untersuchten Proben konnte in der zytologischen Untersuchung (Mittelwert 48,3 Zellen/ μ l Liquor, Range 1 bis 198 Zellen/ μ l Liquor) eine maligne Erkrankung im Liquor sicher ausgeschlossen werden. Dieser Befund bestätigte sich in der KOC-PCR, alle sechs Proben waren KOC negativ. An einem Patienten (CMV-Enzephalitis) mit der Probennummer 38 wurden im Verlauf noch zwei weitere Liquorpunktionen im Abstand von 4 und 70 Tagen durchgeführt. Die übrigen Patienten wurden nicht mehr punktiert.

Tabelle 3: Reaktive Liquorbefunde, 6 Patienten, bei einem Patienten insgesamt 3 Punktionen

CMV-Meningoenzephalitis, Pneumonie, Pankreatitis, Sepsis, Morbus Crohn, Staph. aureus Meningitis					
Entnahme Nr.	Patienten	Zyto + /KOC +	Zyto - /KOC +	Zyto + /KOC -	Zyto - /KOC -
1	6	0	0	0	6
2	1	0	0	0	1
3	1	0	0	0	1

(CMV= Cytomegalievirus; Staph.= Staphylokokkus, KOC= KH-domain containing protein overexpressed in cancer, Zyto= Zytologie)

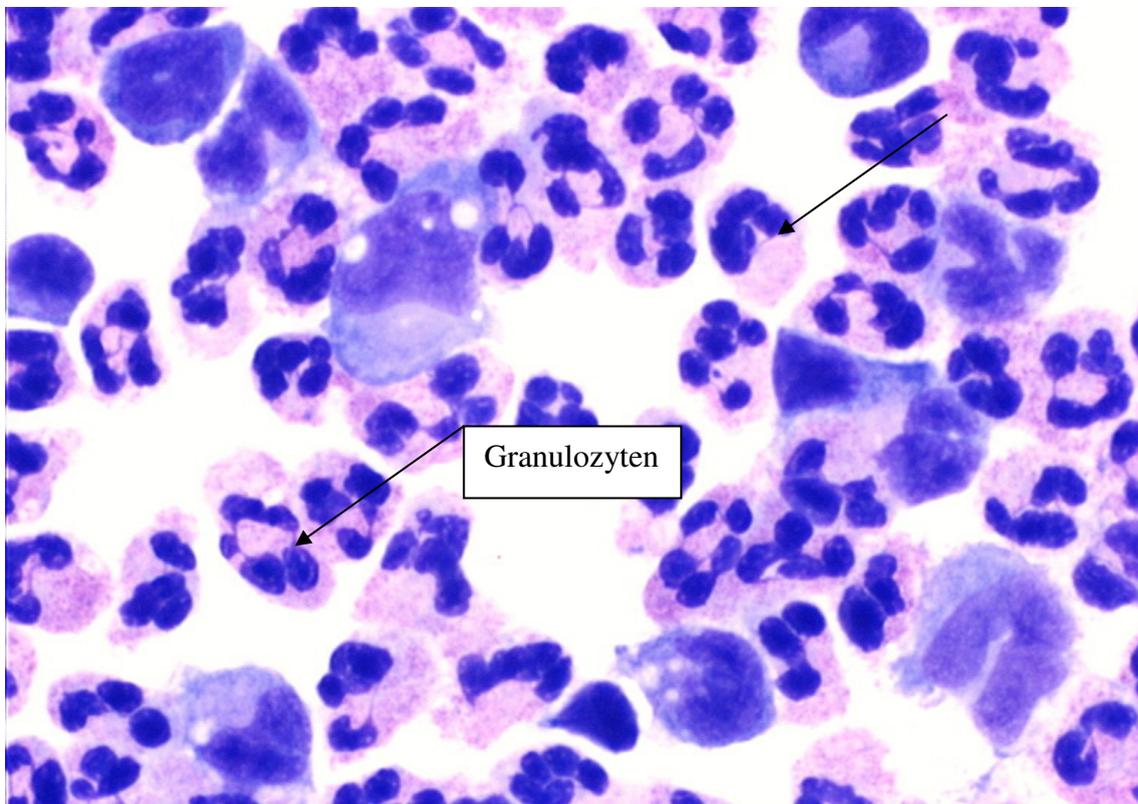


ABBILDUNG 2: GRANULOZYTÄRE ENTZÜNDUNG IM LIQUOR, MAY-GRÜNEWALD/ GIEMSA-FÄRBUNG (100-fache Vergrößerung) zytologisches Labor, Dr. M. Bommer, Innere Medizin III, Universität Ulm

3.2 Myeloische Leukämien (AML und CML)

Elf Patienten (acht Männer und drei Frauen, Altersmittelwert 54,5 Jahre, Range 17 bis 81 Jahre) wurden mit der Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie sowie einer chronisch myeloischen Leukämie bei Verdacht auf eine Mitbeteiligung des Liquorraums ebenfalls einer Liquorpunktion unterzogen (Mittelwert 126,3 Zellen/ µl Liquor, Range 1 bis 884 Zellen/µl Liquor).

Bei zwei in der Zytologie positiven Proben konnte KOC nachgewiesen werden. Bei einem Patienten (Probe Nr. 36) mit einer akuten myeloischen Leukämie wurde drei mal im Abstand von zwölf und vierzehn Tagen (884, 11 und 5 Zellen/ µl Liquor) KOC mit einer jeweils positiven Zytologie nachgewiesen. In diesem Fall war die KOC-Analyse bei abnehmender Liquorzellzahl unter sequentieller intrathekaler Therapie und weiter positiver Zytologie ebenfalls positiv.

In der ersten Punktion waren bei sechs Proben sowohl die Zytologie als auch die KOC-PCR negativ. Bei zwei Patienten konnte diese Konstellation in einer zweiten Liquorprobe bestätigt werden.

Diskrepante Ergebnisse lieferten zwei in der ersten Zytologie positive Liquorproben (Nr. 27, 28): die KOC-PCR fiel negativ aus. Dieses negative Ergebnis ergab sich bei den gleichen zwei Patienten erneut bei einer anschließenden Wiederholung der Punktion.

Bei Patient Nr. 27 konnte bei einer dritten und vierten Untersuchung, im Gegensatz zur ersten und zweiten Punktion, nach intrathekaler Applikation von Methotrexat und AraC (Arabinosyl-Cytosin) in der zytologischen Begutachtung kein Liquorbefall mehr nachgewiesen werden. Die KOC-PCR fiel wie in den vorangegangenen Untersuchungen erneut negativ aus.

Tabelle 4: Myeloische Leukämien (Chronisch myeloische und Akute myeloische Leukämie) 11 Patienten

Entnahme Nr.	KOC+ Zyto gesamt	Zyto + / KOC +	Zyto - / KOC +	Zyto + / KOC -	Zyto - / KOC -
1	11	2	0	2	7
2	6	1	0	2	3
3	3	1	0	0	2
4	2	0	0	0	1

(KOC= KH-domain containing protein overexpressed in cancer; Zyto= Zytologie)

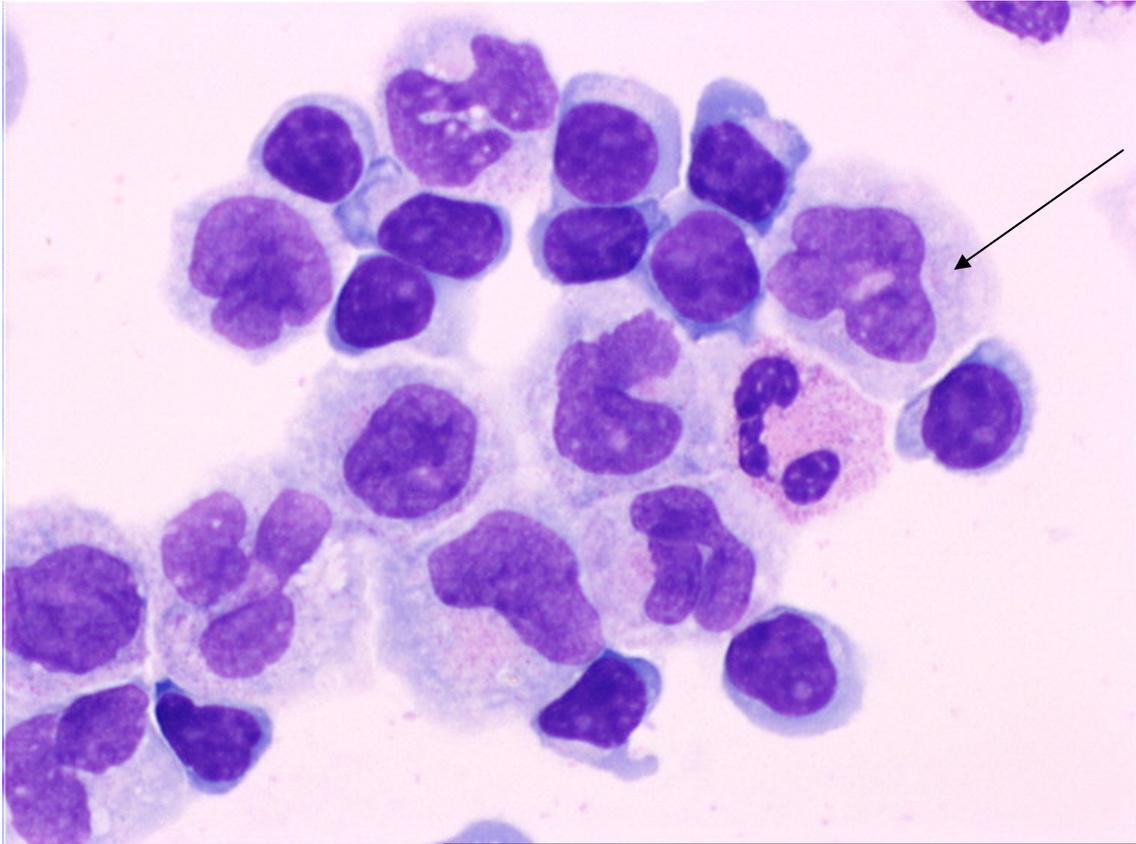


ABBILDUNG 3: AKUTE MYELOISCHE LEUKÄMIE (MYELOMONOZYTÄR), LIQUORZITOLOGIE, MAY-GRÜNEWALD/ GIEMSA-FÄRBUNG (100-fache Vergrößerung)
zytologisches Labor, Dr. M. Bommer, Innere Medizin III, Universität Ulm

3.3. Akute lymphatische Leukämie und lymphatische Blastenschübe bei CML, maligne und indolente Non-Hodgkin-Lymphome, M. Hodgkin

23 Patienten (15 Männer und 8 Frauen, Altersmittelwert 47,5 Jahre, Range 17 bis 81 Jahre) mit einer diagnostizierten ALL, einer CML im lymphatischen Blastenschub, einem hochmalignen Non Hodgkin Lymphom (NHL) und der Diagnose eines indolenten Lymphoms sowie eines M. Hodgkin wurden ebenfalls bei dringendem Verdacht auf eine maligne ZNS-Mitbeteiligung durch ihre Grunderkrankung einer Liquordiagnostik unterzogen. Der Mittelwert der Liquorzellzahl lag bei 15,5 Zellen/ μl (Range 1 bis 155 Zellen/ μl).

Bei 16 Patienten konnte zytologisch bei der ersten Punktion kein Befall nachgewiesen werden, konkordant hierzu war die negative KOC-PCR. Bei drei Patienten wurde in der Primärdiagnostik ein maligner Befall des Liquors durch eine lymphatische Leukämie (ALL, B-CLL, Mantelzell-Lymphom) festgestellt, die KOC-PCR war bei diesen Proben positiv. Bei einem Patienten mit der Diagnose Mantelzell-Lymphom (Probe Nr. 22) wurde dieses Ergebnis in der zweiten Untersuchung bestätigt.

Beim Patienten mit der Probe Nr. 4 deckten sich die nach 21, 23 und 27 Tagen erneut durchgeführten Punktionen bei nun negativer Zytologie mit einem nun auch negativ gewordenen KOC-Nachweis. Der Patient erhielt nach der ersten Punktion eine intrathekale Chemotherapie mit Methotrexat (MTX).

Lediglich ein Patient (Probe Nr. 20) lieferte bei drei weiteren Punktionen nach vier, sieben und elf Tagen eine Diskrepanz zwischen weiterhin positiver Zytologie und einem nun negativen KOC-Nachweis.

Auch der Patient mit der Probennummer 16 zeigte in dieser Gruppe eine Diskrepanz. Trotz der negativen Zytologie lieferte die PCR für das KOC ein positives Ergebnis.

Bei insgesamt elf Patienten aus der Gruppe der lymphatischen Reihe (ALL, CLL, Lymphom, CML, M. Hodgkin) wurde im Verlauf nach 5 Tagen im Median (Range 2 bis 93 Tage) eine erneute Kontrolle des Liquors durchgeführt (12,4 Zellen/ µl Liquor im Mittel, Range 1 bis 69 Zellen/ µl Liquor). Bei sieben Patienten war die Zytologie, wie auch die KOC-PCR, negativ.

In diese Gruppe wurde auch eine Patientin (17 Jahre alt) mit einem Morbus Hodgkin aufgenommen. Bei ihr wurden zwei Punktionen im Abstand von drei Tagen und einer Zellzahl von 54 bzw. 22 Zellen/ µl Liquor durchgeführt. Beide Male konnte ein Befall des ZNS durch Hodgkin-Zellen zytologisch ausgeschlossen werden. Jedoch fiel das KOC bei der ersten Punktion positiv aus. In der zweiten Liquorprobe war das KOC nun korrelierend zum negativen zytologischen Befund negativ ausgefallen.

Tabelle 5: Lymphatische Leukämien und maligne Lymphome, 23 Patienten

Entnahme Nr.	KOC+ Zyto gesamt	Zyto + /KOC +	Zyto - /KOC +	Zyto + /KOC -	Zyto - /KOC -
1	23	3	2	2	16
2	11	1	0	3	7
3	2	0	0	1	1
4	2	0	0	1	1

(KOC= KH-domain containing protein overexpressed in cancer; Zyto= Zytologie)

3.4. Solide Tumore

Drei Patienten wurden mit den Diagnosen Adeno-Karzinom des Colon mit intracerebralen Metastasen, supraselläres Kraniopharyngeom und metastasiertes Adeno-Bronchial-Karzinom ebenfalls einer Liquorpunktion unterzogen. Bei den drei Patienten (eine Frau, zwei Männer, Altersmittelwert 57 Jahre, Range 37 bis 71 Jahre) wurde einmalig Liquor mit einem Mittelwert von 3 Zellen/ μl Liquor (Range 3 bis 6 Zellen/ μl) gewonnen.

In keiner der untersuchten Liquorproben konnten morphologisch maligne Zellen identifiziert werden. Konkordant hierzu waren alle Proben in der KOC-PCR negativ.

Tabelle 6: Solide Tumoren (3 Patienten: Adeno-Carcinom des Colon, Bronchialcarcinom, Kraniopharyngeom)

Entnahme Nr.	KOC+ Zyto gesamt	Zyto + /KOC +	Zyto - /KOC +	Zyto + /KOC -	Zyto - /KOC -
1	3	0	0	0	3

(KOC= KH-domain containing protein overexpressed in cancer; Zyto= Zytologie)

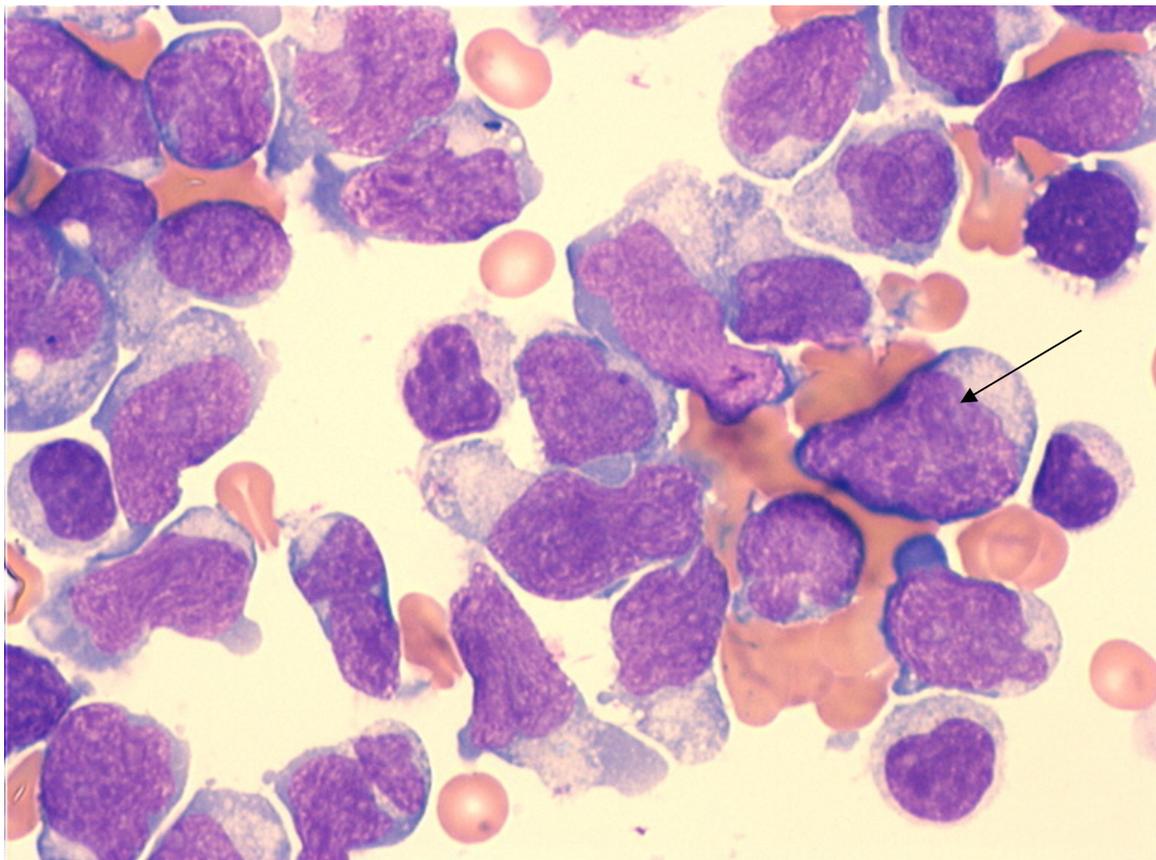


ABBILDUNG 4: LIQUOR, HOCHMALIGNES B-NON-HODGKIN-LYMPHOM MIT ZENTRALEM-NERVENSYSTEM BEFALL, MAY-GRÜNEWALD/GIEMSA-FÄRBUNG (100-fache Vergrößerung)
zytologisches Labor, Dr. M. Bommer, Innere Medizin III, Universität Ulm

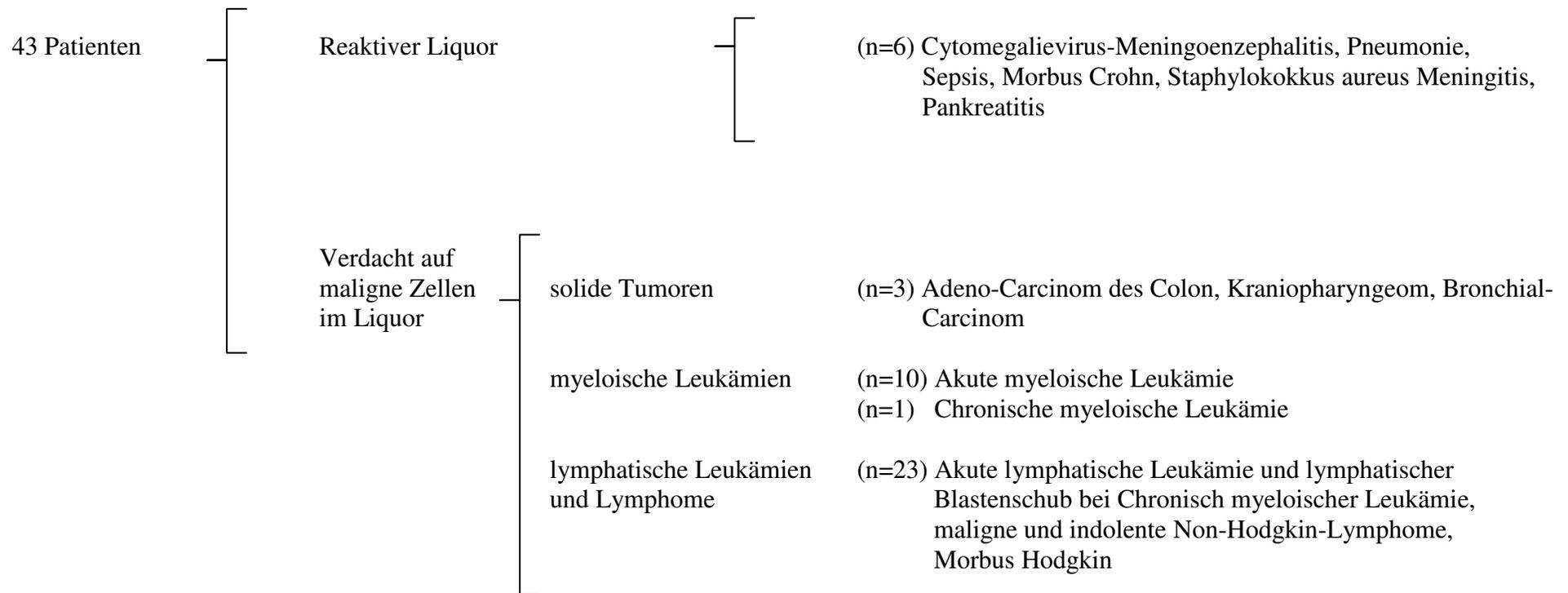


ABBILDUNG 5: ÜBERSICHT DER UNTERSUCHTEN PATIENTEN

Tabelle 7: Übersicht der Ergebnisse

a	Pr.Nr.		Punktion 1			Punktion 2				Punktion 3				Punktion 4				
			C	K	ZZ	C	K	d	ZZ	C	K	d	ZZ	C	K	d	ZZ	
Solide Tumoren																		
63	1	Bronchialcarcinom	-	-	3													
71	2	Adeno-Carcinom des Colon	-	-	1													
37	3	Kraniopharyngeom	-	-	6													
lymph. Leukämie, Lymphom																		
50	4	Prä-prä-B-ALL	+	+	6	-	-	21	1	-	-	23	2	-	-	27	0	
60	5	T-ALL	-	-	2													
22	6	C-ALL	-	-	1	-	-	25	2									
59	7	Prä-T-ALL	-	-	4	-	-	2	3									
51	8	T-ALL	-	-	3													
32	9	T-ALL	-	-	1	-	-	2	2									
56	10	C-ALL	-	-	2	-	-	93	6									
30	11	T-ALL	-	-	2													
60	12	T-ALL	-	-	6													
30	13	Burkitt-Lymphom	-	-	1													
59	14	Großzellig diffus	-	-	1													
39	15	Peripheres T-Zell-Lymphom	-	-	2													
73	16	Großzellig diffus	-	+	2													
35	17	Burkitt-like-Lymphom	-	-	5													
57	18	Primäres ZNS-Lymphom (Großzellig diffus)	-	-	4	-	-	21	1									
31	19	B-CLL, Binet C	+	-	65	+	-	14	15									
37	20	B-CLL, Richter Transformation	+	+	21	+	-	4	10	+	-	7	6	+	-	11	11	
58	21	Follikuläres Lymphom	-	-	1													
67	22	Mantelzell-Lymphom	+	+	155	+	++	2	69									
81	23	B-Zell-Lymphom NOS	-	-	2													
53	24	CML, lymph. Blastenschub	+	-	5	+	-	3	5									
36	25	EBV –Lymphom	-	-	11													
17	26	Morbus Hodgkin	-	+	54	-	-	3	22									
myeloische Leukämien																		
41	27	AML FAB M4	+	-	36	+	-	5	4	-	-	44	1	-	-	51	2	
44	28	AML FAB M3v	+	-	4	+	-	3	17									
21	29	AML FAB M4eo	-	-	2													
54	30	AML FAB M1	-	-	21	-	-	29	3									
66	31	AML FAB M5b	+	++	433													
63	32	AML FAB M5	-	-	1													
63	33	AML FAB M0	+	(+)	4	+	(+)	3	4	-	-	11	2	-	-	18	1	
65	34	AML FAB M7	-	-	1													
66	35	AML FAB M4	-	-	1	-	-	1	1									
76	36	AML FAB M0	+	++	884	+	++	12	11	+	+	14	5					
41	37	CML	-	-	2													
Reaktive Prozesse																		
39	38	CMV-Encephalitis	-	-	189	-	-	4	280	-	-	70	21					
63	39	Sepsis	-	-	3													
70	40	Pneumonie	-	-	2													
61	41	Staph. aureus Meningitis	-	-	93													
32	42	Morbus Crohn	-	-	1													
59	43	akute Pankreatitis	-	-	2													

K = KOC; C = Zytologie; ZZ = Zellzahl (μ l); a= Patientenalter; Pr.Nr.= Probennummer; d= Tage zwischen Wiederholungspunktion und 1. Punktion; ALL= Akute lymphatische Leukämie; ZNS= Zentrales Nervensystem; CLL= Chronisch lymphatische Leukämie; NOS= not otherwise specified= nicht weiter klassifiziert; FAB= French-American-British-Group; Chronisch myeloische Leukämie; lymph.= lymphatisch; EBV= Epstein-Barr-Virus; AML= Akute myeloische Leukämie; CMV= Cytomegalievirus; Staph.= Staphylococcus;

4. Diskussion

Die Mitbeteiligung des ZNS ist eine häufige Komplikation akuter Leukämien und aggressiver Non-Hodgkin-Lymphome. Die dann erforderliche spezifische Behandlung des ZNS ist aufwändig und geht mit teilweise erheblichen Nebenwirkungen einher. Insbesondere die Kombination aus Strahlentherapie und intrathekaler Chemotherapie führt teilweise zu einer Leukenzephalopathie mit Beeinträchtigung der cerebralen Leistungsfähigkeit [20]. Da ein Befall des ZNS initial oft asymptomatisch ist, gehört die Lumbalpunktion und die anschließende morphologische Untersuchung des Liquors nach wie vor zur Stagingprozedur [2, 10]. In Zweifelsfällen kann eine zusätzliche Immuntypisierung den Informationsgehalt der Untersuchung erhöhen. Sinnvoll ist dies allerdings nur bei Erkrankungen, die mittels spezifischer Oberflächenmarker charakterisiert werden können. Trotz der Fortschritte in der bildgebenden Diagnostik des ZNS ist die zytologische Untersuchung des Liquors auf maligne Zellen immer noch das diagnostische Mittel der Wahl [9].

Wie die Praxis der zytologischen Untersuchung von Liquorproben zeigt, führen viele Probleme zu einer unzureichenden diagnostischen Sicherheit. So kann auch der erfahrene Zytopathologe oft keine eindeutige Diagnose stellen. Zu geringe Probenmenge, schlecht erhaltenes Material oder eine blutige Punktion können die Aussagekraft erschweren [9]. Insbesondere Verlaufskontrollen, die den Erfolg einer intrathekalen Therapie evaluieren sollen, sind in aller Regel auf alleiniger Basis zytologischer Untersuchungen schwierig. Üblicherweise wird bei positiver Liquorzytologie solange mit intrathekaler Therapie behandelt, bis eine vollständige zytologische Negativität erreicht wird. Bei den möglichen Fehlerquellen der Zytologie sollte allerdings die rein morphologische Diagnostik ergänzt werden durch ein spezifischeres Verfahren.

Ziel dieser Pilotstudie war es, die technische Machbarkeit der KOC-RT-PCR an Liquor zu prüfen und möglichst viele Tumorentitäten hinsichtlich der Anwendbarkeit der Methode zu evaluieren. Außerdem sollten entzündliche Prozesse mit hinreichender Sicherheit von Malignomen abgegrenzt werden.

Für maligne Lymphome und Leukämien stand ausreichend Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Proben entzündlicher Veränderungen waren nur von 6 Patienten, Material von Patienten mit soliden Tumoren nur von 3 Patienten verfügbar.

Unsere Untersuchung konnte zeigen, dass die Methodik an den geringen zur Verfügung stehenden Mengen von Liquor mit hinreichender Zuverlässigkeit möglich ist.

Bei der Auswahl der untersuchten Proben wurden bewusst reaktive Befunde untersucht, um zu prüfen, ob eine ausreichende Trennung zwischen potentiell malignen und sicher nicht malignen Befunden möglich ist. In unserer Untersuchung konnten die reaktiven Befunde mit hoher Zuverlässigkeit als KOC negativ identifiziert werden. Selbst eine Liquorprobe mit einem hohen Anteil von Lymphozyten bei einem Patienten mit einer CMV-Enzephalitis war in der KOC-PCR negativ. Einschränkend ist allerdings die in dieser Gruppe niedrige Fallzahl.

Liquorproben von Patienten mit malignen Grunderkrankungen wurden je nach Ihrer Möglichkeit der Zuordnung in myeloisch, lymphatisch oder nicht-hämopoetisch (epithelial) eingeteilt und analysiert.

Die größte Gruppe stellten Patienten mit ALL und malignen Lymphomen dar. Bei einer Patientin mit der unreifsten Form der untersuchten Erkrankungen, einer Prä-prä-B-ALL, war sowohl morphologisch als auch mittels der KOC-PCR ein Liquorbefall diagnostiziert worden. Die beiden Patienten mit C-ALL waren wie die Patienten mit T-ALL sowohl zytologisch als auch mittels KOC unauffällig. Morphologisch eindeutig befallen war der Liquor des Patienten mit Mantelzell-Lymphom, konkordant dabei die starke Positivität für KOC. Die beiden Patienten mit B-CLL (Probennummer 19 und 20) waren zytologisch auffällig. Allerdings war die KOC-PCR nur eines Patienten mit B-CLL in Richter-Transformation positiv (Transformation einer B-CLL in ein sekundär höher malignes NHL, mit einer ungünstigeren Prognose und schlechteren Therapiemöglichkeit), während die Untersuchung bei der B-CLL ohne Zeichen der Transformation negativ war. Möglicherweise ist die KOC-Expression auch hier Ausdruck der fehlenden Reife der Zellen.

Der einzige Patient im (lymphatischen) Blastenschub einer CML hatte einen morphologisch eindeutigen Befall des ZNS, allerdings eine negative KOC-PCR.

KOC positiv ohne klinische oder zytomorphologische Hinweise für einen ZNS-Befall war eine Patientin mit M. Hodgkin, eine Erkrankung, die extrem selten zu ZNS-Befall neigt. Dieser Befund ist offensichtlich falsch positiv, da auch im weiteren klinischen Verlauf keine Hinweise für einen ZNS-Befall auftraten.

Ähnlich gelagert ist der Fall eines Patienten mit einem malignen B-NHL (großzellig diffus) mit extranodalem Befall der Haut, aber ohne Hinweis auf einen ZNS-Befall. Auch hier war die KOC-PCR positiv, während der Liquor zytologisch ohne pathologischen Befund war.

Bemerkenswert ist der einzige Fall eines Transplantations-assoziierten EBV-Lymphoms (Eppstein-Barr-Virus) des ZNS in unserer Untersuchung mit Nachweis einer morphologisch auffälligen Zellpopulation im Liquor, allerdings ohne KOC-Nachweis. EBV-Lymphome sind oligoklonale B-Zellneoplasien, die insbesondere bei immunsupprimierten Patienten nach Organ- oder Stammzelltransplantationen auftreten [14]. Charakteristischerweise sind diese B-Zellen reif und häufig in der Lage Immunglobulin-Schwerketten zu produzieren und damit in ihrer Differenzierung nahe bei reifen Plasmazellen, was eine mögliche Erklärung für die negative KOC-PCR bei auffälliger Zytologie sein kann.

Zweitgrößte Gruppe waren die myeloischen Leukämien (AML) mit insgesamt 11 untersuchten Patienten. Sechs der Untersuchten – inklusive der einzigen CML in chronischer Phase - waren zytologisch und hierzu korrelierend in der KOC-PCR negativ. Bei drei Patienten konnte sowohl morphologisch als auch in der KOC-PCR ein Befall des Liquors diagnostiziert werden. Die Verlaufsuntersuchungen dieser Patienten bestätigten – soweit vorhanden – die initialen Resultate.

Bei zwei Patienten waren KOC und Zytologie diskrepant: Ein Patient mit einer AML FAB M4 war zytologisch – auch retrospektiv bei nochmaliger Durchsicht der Präparate - eindeutig als positiv zu bewerten. Hierzu passte die signifikant erhöhte Liquorzellzahl (36/ μ l). Bei der Patientin mit der Probe Nr. 28 wurde der Liquor trotz normaler Liquorzellzahl morphologisch als befallen interpretiert, eine Einschätzung, die retrospektiv an den Präparaten durchaus nachvollzogen werden kann. Trotzdem fiel die KOC-PCR bei beiden Proben negativ aus. Ursache der Diskrepanz ist damit mit gewisser Wahrscheinlichkeit nicht in einer fehlerhaften Interpretation des zytologischen Präparates zu suchen. Eine teilweise bei mehreren Punktionen negative KOC-PCR macht eine fehlerhafte Technik oder Interpretation der KOC-PCR ebenfalls unwahrscheinlich. Beide Erkrankungen – AML M3v und AML M4 – sind gekennzeichnet durch eine zumindest teilweise Ausreifung der Leukämie und damit möglicherweise eine fehlende Expression von KOC. Unterstützt wird diese Hypothese durch den deutlichen Nachweis von KOC in den drei unreifen Leukämien (2x AML M0 sowie AML M5b).

Die wenigen untersuchten Patienten mit soliden Tumoren hatten allesamt keine auffällige Liquorzytologie. Konkordant hierzu war die KOC-PCR in allen drei Fällen negativ.

Wichtig für die Bewertung der KOC-Diagnostik sind insbesondere Untersuchungen an Liquorproben von Patienten mit entzündlichen Veränderungen ohne maligne Grunderkrankung. Alle untersuchten Proben waren KOC negativ, selbst bei hohen Zellzahlen mit lymphozytärer (CMV-Enzephalitis) oder granulozytärer Dominanz (Staphylokokkus aureus Meningitis). Dieses Ergebnis ist ein Hinweis auf die zu erwartende Spezifität der Methode, wenngleich die Interpretation ob der geringen Fallzahl nur mit Vorsicht vorgenommen werden darf.

Das von uns ausgewertete Probenmaterial kann somit als Grundlage dienen, diese Methode an einem größeren Patientengut zu evaluieren, um dann eine genauere Aussage über den eventuellen Nutzen für eine breite klinische Nutzung machen zu können. Vielversprechend scheint die Methode bei der Gruppe der unreifzelligen Leukämien und Lymphome zu sein, weswegen hierauf besonderes Augenmerk gerichtet werden sollte.

5. Zusammenfassung

Die stetig wachsende Zahl neuer genetischer Veränderungen, die in malignen Tumoren entdeckt werden, bieten die Gelegenheit, an immer kleiner werdenden Gewebe- und Sekretproben immer spezifischere Aussagen treffen zu können. Die Diagnostik maligner ZNS-Erkrankungen ist bislang eine Domäne der Radiologie sowie – mit Einschränkungen in bestimmten Fällen – der Liquorzytologie.

1997 hat die Arbeitsgruppe von Mueller-Pillasch et al. in einer weit angelegten Untersuchung für unterschiedliche exprimierte Genprodukte in Pankreaskarzinomzellen ein Gen identifiziert, welches ein neuartiges Protein mit vier K-homologen (KH) Domänen kodiert. Dieses KOC genannte Gen (KH-domain containing protein overexpressed in cancer) ist im Pankreaskarzinom überexprimiert und in entzündlichem oder normalem Zellgut nicht nachweisbar.

Das vorliegende Datenmaterial legt den Schluss nahe, dass KOC (KH-domain containing protein overexpressed in cancer) insbesondere in malignen Tumoren und im embryonalen Gewebe exprimiert wird und deswegen ein ideales Ziel zur Diskrimination maligner und benigner Prozesse bei adulten Organismen darstellt.

Ziel dieser Studie war es, die technische Machbarkeit der KOC-RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion) an Liquor zu prüfen und möglichst viele Tumorentitäten hinsichtlich der Anwendbarkeit der Methode zu evaluieren. Außerdem sollten entzündliche Prozesse mit hinreichender Sicherheit von Malignomen abgegrenzt werden.

71 Liquorproben von 43 Patienten wurden auf die Expression von KOC mittels RT-PCR sowie zytologisch untersucht. Die Patienten wurden dabei in die vier Gruppen reaktive Veränderungen, maligne myeloische Leukämien, maligne lymphatische Erkrankungen sowie solide Tumoren eingeteilt.

Vorausgesetzt die zytologische Untersuchung wird als Standard zur Beurteilung maligne versus benigne herangezogen, hat die KOC-Diagnostik am Gesamtkollektiv eine Sensitivität von 60%, eine Spezifität von 94% sowie einen positiven prädiktiven Wert von 75% bei einem negativen prädiktiven Wert von 89% ergeben.

Mit dem neuen Marker KOC (KH-domain containing protein over expressed in cancer) könnte nun ein Merkmal identifiziert worden sein, das insbesondere bei sehr unreifen Malignomen wie Precursor-Leukämien und unreifen Lymphomen die Diagnostik des

Primärbefalls und die Verlaufskontrolle unter Therapie vereinfacht und präzisiert. Während offensichtlich die Anwendung der KOC-RT-PCR bei reifzelligen Lymphomen und Leukämien nicht Erfolg versprechend zu sein scheint, sind die Befunde bei unreifen Leukämien und Lymphomen durchaus interessant. Besonders die gute Abgrenzbarkeit gegenüber reaktiven Befunden scheint eine der Stärken des Verfahrens zu sein.

6. Literaturverzeichnis

1. Bamborschke, S. and M. Huber, *Cerebrospinal fluid cytology in meningeal invasion of leukemia and malignant lymphoma. Reliable diagnosis by immunocytochemistry.* Nervenarzt. 63: 218-22 (1992).
2. Bashir, R.M., P.J. Bierman, J.M. Vose, D.D. Weisenburger, and J.O. Armitage, *Central nervous system involvement in patients with diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma.* Am J Clin Oncol. 14: 478-82 (1991).
3. Billingham, M.E., D.G. Rawlinson, P.F. Berry, and R.L. Kempson, *The cytodagnosis of malignant lymphomas and Hodgkin's disease in cerebrospinal, pleural and ascitic fluids.* Acta Cytol. 19: 547-56 (1975).
4. Cuttner, J., R. Meyer, and Y.P. Huang, *Intracerebral involvement in Hodgkin's disease: a report of 6 cases and review of the literature.* Cancer. 43: 1497-506 (1979).
5. DeAngelis, L.M., *Current diagnosis and treatment of leptomeningeal metastasis.* J Neurooncol. 38: 245-52 (1998).
6. Dekker, A.W., A. Elderson, K. Punt, and J.J. Sixma, *Meningeal involvement in patients with acute nonlymphocytic leukemia. Incidence, management, and predictive factors.* Cancer. 56: 2078-82 (1985).
7. Eclache, V., T. Vu, and G. Le Roux, *D-dimer levels in the cerebrospinal fluid: a marker of central nervous system involvement in neoplastic disease.* Nouv Rev Fr Hematol. 36: 321-4 (1994).
8. Finn, W.G., L.C. Peterson, C. James, and C.L. Goolsby, *Enhanced detection of malignant lymphoma in cerebrospinal fluid by multiparameter flow cytometry.* Am J Clin Pathol. 110: 341-6 (1998).

9. Glantz, M.J., B.F. Cole, L.K. Glantz, J. Cobb, P. Mills, A. Lekos, B.C. Walters, and L.D. Recht, *Cerebrospinal fluid cytology in patients with cancer: minimizing false-negative results*. *Cancer*. 82: 733-9 (1998).
10. Hoelzer, D. and R.P. Gale, *Acute lymphoblastic leukemia in adults: recent progress, future directions*. *Semin Hematol*. 24: 27-39 (1987).
11. Hoerni-Simon, G., J.P. Suchaud, H. Eghbali, J.M. Coindre, and B. Hoerni, *Secondary involvement of the central nervous system in malignant non-Hodgkin's lymphoma. A study of 30 cases in a series of 498 patients*. *Oncology*. 44: 98-101 (1987).
12. Hovestadt, A., S.C. Henzen-Logmans, and C.J. Vecht, *Immunohistochemical analysis of the cerebrospinal fluid for carcinomatous and lymphomatous leptomeningitis*. *Br J Cancer*. 62: 653-4 (1990).
13. Ishii, E., S. Ohga, I. Murano, M. Kobayashi, K. Kimura, H. Eguchi, K. Akazawa, and K. Ueda, *Tumor necrosis factor in the cerebrospinal fluid of children with central nervous system leukemia*. *Leuk Res*. 15: 143-7 (1991).
14. Bommer, M. (2005 persönliche Mitteilung), nach: Jaffe, E.S., *Pathology and Genetics: Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissue*. *Lymphoid tissue Pathology 3*: 110-271(2001).
15. Kersten, M.J., L.M. Evers, P.L. DelleMijn, H. van den Berg, P. Portegies, R.Q. Hintzen, R.A. van Lier, A.E. von dem Borne, and R.H. van Oers, *Elevation of cerebrospinal fluid soluble CD27 levels in patients with meningeal localization of lymphoid malignancies*. *Blood*. 87: 1985-9 (1996).
16. Kitajima, M., Y. Korogi, Y. Shigematsu, L. Liang, M. Matsuoka, T. Yamamoto, M. Jhono, K. Eto, and M. Takahashi, *Central nervous system lesions in adult T-cell leukaemia: MRI and pathology*. *Neuroradiology*. 44: 559-67 (2002).

17. Koskiniemi, M., J. Rajantie, J. Rautonen, M.L. Laipio, E.M. Salonen, M.A. Siimes, and A. Vaheri, *Fibronectin concentration in cerebrospinal fluid reflects early central nervous system involvement in children with acute lymphoblastic leukemia*. Leuk Res. 14: 449-52 (1990).
18. Kotasek, D., L.E. Albertyn, and R.E. Sage, *A five-year experience with central nervous system lymphoma*. Med J Aust. 144: 299-303 (1986).
19. Koyama, T., M. Ogawa, S. Kurata, M. Komazawa, and M. Murakami, *Meningeal malignant melanoma in a child: immunocytological diagnosis*. Acta Paediatr Jpn. 34: 173-8 (1992).
20. Kuker, W., P. Bader, U. Herrlinger, S. Heckl, and T. Nagele, *Transient encephalopathy after intrathecal methotrexate chemotherapy: diffusion-weighted MRI*. J Neurooncol. 73: 47-9 (2005).
21. Lopez Almaraz, R., A. Montesdeoca Melian, and J. Rodriguez Luis, *The role of molecular genetics in childhood cancer*. An Pediatr (Barc). 59: 334-44 (2003).
22. Lossos, I.S., R. Breuer, O. Intrator, and A. Lossos, *Cerebrospinal fluid lactate dehydrogenase isoenzyme analysis for the diagnosis of central nervous system involvement in hematologic patients*. Cancer. 88: 1599-604 (2000).
23. Macapinlac, H.A., *The utility of 2-deoxy-2- 18[F]fluoro-D-glucose-positron emission tomography and combined positron emission tomography and computed tomography in lymphoma and melanoma*. Mol Imaging Biol. 6: 200-7 (2004).
24. Maisey, M.N., *Overview of clinical PET*. Br J Radiol. 75 Spec No: S1-5 (2002).
25. Mueller-Pillasch, F., U. Lacher, C. Wallrapp, A. Micha, F. Zimmerhackl, H. Hameister, G. Varga, H. Friess, M. Buchler, H.G. Beger, M.R. Vila, G. Adler, and T.M. Gress, *Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein*. Oncogene. 14: 2729-33 (1997).

26. Mueller-Pillasch, F., B. Pohl, M. Wilda, U. Lacher, M. Beil, C. Wallrapp, H. Hameister, W. Knochel, G. Adler, and T.M. Gress, *Expression of the highly conserved RNA binding protein KOC in embryogenesis*. Mech Dev. 88: 95-9 (1999).
27. Mueller, F., M. Bommer, U. Lacher, C. Ruhland, V. Stagge, G. Adler, T.M. Gress, and T. Seufferlein, *KOC is a novel molecular indicator of malignancy*. Br J Cancer. 88: 699-701 (2003).
28. Porto, L., M. Kieslich, D. Schwabe, F.E. Zanella, and H. Lanfermann, *Central nervous system imaging in childhood leukaemia*. Eur J Cancer. 40: 2082-90 (2004).
29. Raz, I., T. Siegal, T. Siegal, and A. Polliack, *CNS involvement by non-Hodgkin's lymphoma. Response to a standard therapeutic protocol*. Arch Neurol. 41: 1167-71 (1984).
30. Recht, L., D.J. Straus, C. Cirrincione, H.T. Thaler, and J.B. Posner, *Central nervous system metastases from non-Hodgkin's lymphoma: treatment and prophylaxis*. Am J Med. 84: 425-35 (1988).
31. Roma, A.A., A. Garcia, A. Avagnina, C. Rescia, and B. Elsner, *Lymphoid and myeloid neoplasms involving cerebrospinal fluid: comparison of morphologic examination and immunophenotyping by flow cytometry*. Diagn Cytopathol. 27: 271-5 (2002).
32. Ross, A.F., Y. Oleynikov, E.H. Kislauskis, K.L. Taneja, and R.H. Singer, *Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein*. Mol Cell Biol. 17: 2158-65 (1997).
33. Schoch, C., S. Schnittger, S. Bursch, D. Gerstner, A. Hochhaus, U. Berger, R. Hehlmann, W. Hiddemann, and T. Haferlach, *Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases*. Leukemia. 16: 53-9 (2002).

34. Schumacher, M. and M. Orszagh, *Imaging techniques in neoplastic meningiosis*. J Neurooncol. 38: 111-20 (1998).
35. Tomura, N., H. Hirano, K. Kato, R. Sashi, M. Hashimoto, J. Watarai, and A. Watanabe, *Central nervous system involvement of leukemia and systemic lymphoma in children: CT and MR findings*. No To Shinkei. 49: 993-1000 (1997).
36. Tosaka, M., M. Tamura, N. Oriuchi, M. Horikoshi, T. Joshita, K. Sugawara, S. Kobayashi, H. Kohga, T. Yoshida, and T. Sasaki, *Cerebrospinal fluid immunocytochemical analysis and neuroimaging in the diagnosis of primary leptomeningeal melanoma. Case report*. J Neurosurg. 94: 528-32 (2001).
37. VinSheth, F.J., J.J. Sheth, A.I. Patel, A.D. Shah, and A. Verhest, *Usefulness of cytogenetics in leukemias*. Indian J Cancer. 39: 139-42 (2002).
38. Walts, A.E. and S. Strigle, *Toward optimal use of the cytology laboratory: quality improvement and cerebrospinal fluid specimens*. Diagn Cytopathol. 13: 357-61 (1995).
39. Weller, M., A. Stevens, N. Sommer, M. Schabet, and H. Wietholter, *Humoral CSF parameters in the differential diagnosis of hematologic CNS neoplasia*. Acta Neurol Scand. 86: 129-33 (1992).
40. Wolk, R.W., S.R. Masse, R. Conklin, and E.J. Freireich, *The incidence of central nervous system leukemia in adults with acute leukemia*. Cancer. 33: 863-9 (1974).
41. Yantiss, R.K., B.A. Woda, G.R. Fanger, M. Kalos, G.F. Whalen, H. Tada, D.K. Andersen, K.L. Rock, and K. Dresser, *KOC (K Homology Domain Containing Protein Overexpressed in Cancer): A Novel Molecular Marker That Distinguishes Between Benign and Malignant Lesions of the Pancreas*. Am J Surg Pathol. 29: 188-195 (2005).

42. Young, R.C., D.M. Howser, T. Anderson, R.I. Fisher, E. Jaffe, and V.T. DeVita, Jr., *Central nervous system complications of non-Hodgkin's lymphoma. The potential role for prophylactic therapy.* Am J Med. 66: 435-43 (1979).

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Danken, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. T. Seufferlein für die Überlassung des Themas, die gute Zusammenarbeit während des Erstellens dieser Arbeit und die Korrekturen, wo nötig.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. M. Bommer, welcher mich über den gesamten Zeitraum hinweg mit großem Engagement betreut hat. Er stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite und hat großen Anteil an der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch meiner Familie und meiner Anja, die mich über all die Jahre meines Studiums hinweg begleitet, stets unterstützt und ermutigt haben, mein großes Ziel zu verwirklichen.