

CHARAKTERISIERUNG DER EXPRESSION VON
SOMATOSTATINREZEPTOREN UND DES
CHEMOKINREZEPTORS CXCR4 BEI HODGKIN- UND
NON-HODGKIN-LYMPHOMEN

Dissertation

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

Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Laura Thierfelder
geboren am 22.07.1991 in Jena

Gutachter:

apl. Prof Dr. Amelie Lupp, Jena

PD Dr. Daniel Kämmerer, Bad Berka

Prof. Dr. Markus Raderer, Wien/Österreich

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.07.2019

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
5-J-ÜLR	5-Jahres-Überlebensrate
ABVD	Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
BEACOPPeskaliert	Bleomycin, Etoposid, Adriamycin, Cyclophosphamid, Oncovin, Procarbacin, Prednison, eskaliert mit G-CSF ab Tag 8
Bidest.	Bidestillata
B-NHL	B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CT	Computertomographie
DABCO	1,4-Diaza-bicyclo(2,2,2)octan
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
EBV	Epstein-Barr-Virus
EtOH	Ethanol
FDG	Fluordesoxyglucose
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor, Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
HHV	Humanes Herpesvirus
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1-alpha
HL	Hodgkin-Lymphom
HSR-Zellen	Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen
HTLV	humanes T-lymphotropes Virus
IF-RT	Involved-Field-Radiotherapie
IgG; IgM	Immunglobulin G, Immunglobulin M
IPI	International Prognostic Index
IRS	Immunreaktiver Score
KHL	Klassische Hodgkin Lymphome

LKR	Lymphknotenregion
LP-Zellen	Lymphocyte predominant cells, lymphozyten-prädominante Zellen
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue, Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe
Mb.	Morbus
MCL	Mantelzelllymphom
MZL	Marginalzonenlymphom
NET	Neuroendokrine Tumore
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK	Natürliche Killerzelle
NLPHL	Nodulär lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom
NOS	Not otherwise specified, nicht weiter spezifiziert
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie - Computertomographie
PLL	Prolymphozytenleukämie
PRRT	Peptid-vermittelte Radiorezeptor-Therapie
PTLD	Posttransplantationsassoziierte Lymphoproliferation
RF	Risikofaktor
RSA	Rinderserumalbumin
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDF-1	stromal cell-derived factor-1, CXC-Motiv-Chemokin 12
SST	Somatostatin
SSTR	Somatostatinrezeptor
T-NHL	T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom
UICC	Union international contre le cancer, Internationale Vereinigung gegen Krebs
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	Maligne Lymphome	3
2.1.1	Klassifikation	3
2.1.2	Epidemiologie und Ätiologie	6
2.1.3	Pathologie	8
2.1.4	Klinik und Diagnose	13
2.1.5	Klinische Stadien und Prognose.....	15
2.1.6	Therapie	17
2.2	Somatostatinrezeptoren	19
2.2.1	Somatostatin.....	19
2.2.2	Somatostatinrezeptoren.....	19
2.2.3	Bedeutung der Somatostatinrezeptoren bei malignen Tumoren.....	21
2.2.4	Somatostatin-Analoga.....	22
2.3	Chemokinrezeptor CXCR4	25
2.3.1	Chemokine	25
2.3.2	Aufbau und Funktion des CXCR4	26
2.3.3	Bedeutung bei der Entstehung bösartiger Neubildungen	27
2.3.4	CXCR4-Antagonisten	29
2.3.5	CXCR4-Nachweis mittels ⁶⁸ Ga-Pentixafor-PET/CT	29
2.3.6	Peptid-vermittelte Radiorezeptor-Therapie mit ¹⁷⁷ Lu/ ⁹⁰ Y- Pentixather	30
2.4	Ki-67-Proliferationsindex	32
3	ZIELE DER ARBEIT	33
4	MATERIAL UND METHODEN	34
4.1	Tumorproben	34
4.1.1	Tumormaterial.....	34
4.1.2	Gerätschaften und Materialien für die Herstellung der Gewebeschnitte.....	34
4.1.3	Herstellung der Gewebeschnitte	34
4.2	Immunhistochemie	35
4.2.1	Materialien und Gerätschaften für die Immunhistochemie	35

4.2.2	Prinzip der Immunhistochemie	39
4.2.3	Durchführung der Immunhistochemie	40
4.2.4	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	42
5	ERGEBNISSE	44
5.1	Patientendaten	44
5.2	Immunhistochemie	48
5.2.1	Auswertung der Somatostatinrezeptor-Färbung.....	48
5.2.2	Auswertung der CXCR4-Färbung.....	56
5.2.3	Auswertung der Ki-67-Färbung	59
5.2.4	Häufigkeitsverteilungen und Stärke der Rezeptorpositivitäten	60
5.2.5	Expressionsmuster	62
5.2.6	Standardabweichungen	66
5.3	Korrelationen.....	69
5.3.1	Immunhistochemie und klinische Daten	69
5.3.2	Korrelationen zwischen den Somatostatinrezeptoren und dem CXCR4.....	72
5.3.3	Immunhistochemie und Ki-67-Index	73
6	DISKUSSION	75
6.1	Alters- und Geschlechtsverteilung	75
6.2	Tumorlokalisation	76
6.3	Immunhistochemie der untersuchten Rezeptoren.....	77
6.3.1	Somatostatin-Rezeptoren	77
6.3.2	Rezeptor CXCR4	80
6.3.3	Expressionsmuster der Rezeptoren	82
6.4	Intraindividuelle Standardabweichung.....	84
6.5	Ki-67-Index	85
7	LITERATURVERZEICHNIS	88
8	SCHLUSSFOLGERUNGEN	99
9	ANHANG	102

1 Zusammenfassung

Maligne Lymphome können histologisch in Hodgkin-Lymphome (HL) und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) eingeteilt werden. Die NHL umfassen eine biologisch und klinisch sehr heterogene Gruppe aus über 40 Subtypen, die zu 80 % aus reifen oder unreifen B-Zellen hervorgehen, die restlichen 20 % entstammen von T- und Natürlichen-Killer-Zellen.

Obwohl maligne Lymphome als eine seltene Erkrankung betrachtet werden, ist die Inzidenz in den letzten Jahren gestiegen. Weltweit werden etwa 250.000 neue Fälle pro Jahr verzeichnet, dabei machen sie insgesamt 3 % aller krebsbedingten Todesfälle aus. Das Hodgkin-Lymphom ist eine potenziell heilbare Erkrankung, dennoch führt sie bei ca. 20-30 % der Patienten zu Rezidiven oder zum Tod und auch für Patienten mit NHL in fortgeschrittenen Stadien ist eine komplette Heilung meist nur in 60 % der Fälle möglich. Bis zum Ende des 20. Jahrhunderts bestand die Therapie maligner Lymphome hauptsächlich aus der Kombination von zytotoxischen Chemotherapien mit oder ohne zusätzlicher Strahlentherapie. Die Behandlungsergebnisse waren jedoch in vielen Fällen nicht zufriedenstellend. Durch das wachsende Wissen über die Funktionsweise des Immunsystems und das Zusammenspiel zwischen malignen Zellen und der Tumorprogression, gelingt es zunehmend, neue Zielstrukturen für Diagnose- und Therapieansätze zu finden. Viele Aspekte sind jedoch noch unklar, vor allem da sich die Entitäten in zahlreichen Gesichtspunkten maßgeblich voneinander unterscheiden. Um die Kenntnis über maligne Lymphome auf zellulärer Ebene voranzubringen, wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Proben auf ihre Expression von Somatostatinrezeptoren und CXCR4 hin untersucht.

Es sind fünf Somatostatin-Rezeptorsubtypen bekannt (SSTR1-SSTR5), die alle zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren gehören und über unterschiedliche Signalkaskaden die Sekretion und Proliferation von Zellen inhibitorisch regulieren. In verschiedenen humanen Geweben wurden die SSTR bereits nachgewiesen. Dazu gehören unter anderem Hypophyse, Zerebellum, Speicheldrüsen, Blutgefäße, Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Milz, Pankreas, Duodenum, Ileum, Kolon, Hoden und Eierstöcke. In malignen Tumorgeweben ist die Expression verschiedener Subtypen ebenfalls bekannt. So werden Somatostatin-Analoga bereits erfolgreich in der Behandlung von Neuroendokrinen Tumoren eingesetzt. Aber auch Neuroblastome, Meningeome, kleinzellige Bronchialkarzinome, Mammakarzinome und hepatozelluläre Karzinome exprimieren SST-Rezeptorsubtypen.

Der Chemokinrezeptor CXCR4 stellt aufgrund zahlreicher Funktionen in der Hämatopoese, Organogenese und Vaskularisation, sowie seiner Bedeutung beim Eintritt des HI-Virus in die menschliche Zelle, einen bereits gut erforschten G-Protein-gekoppelten-Rezeptor dar. Auch er wird von vielen humanen Normal- und Tumorgeweben exprimiert, wodurch der CXCR4 diagnostische und therapeutische Ansatzpunkte in der Onkologie bietet. So wurden erste vielversprechende Untersuchungen über die Behandlung von Patienten mit Multiplem Myelomen durch radioaktiv-markierte CXCR4-Antagonisten veröffentlicht.

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 101 Tumorblöcke von 47 Patienten untersucht. Darunter befanden sich 2 Patienten mit HL und 45 Patienten mit verschiedenen NHL (3 B-Zell-Leukämien, 2 Mantelzelllymphome, 1 Marginalzonenlymphom, 2 T-Zell-Lymphome, 37 nicht weiter klassifizierte NHL). Alle Proben wurden immunhistochemisch mit spezifischen Antikörpern gegen die fünf SST-Rezeptorsubtypen (SSTR1-SSTR5) sowie den CXCR4 gefärbt und anschließend lichtmikroskopisch untersucht. Die Auswertung erfolgte anhand des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner (IRS).

Der CXCR4 wurde von etwa der Hälfte der Lymphome exprimiert und konnte damit im Vergleich zu den SSTR wesentlich häufiger, als auch mit einer intensiveren Färbung, nachgewiesen werden. Unter den NHL-Proben wurden als prädominante Rezeptorsubtypen der SSTR2 und der SSTR3 exprimiert. Der SSTR1 konnte nur selten nachgewiesen werden; der SSTR4 und der SSTR5 war in keinem der NHL-Präparate positiv. Im Kontrast dazu erreichten beide HL-Präparate positive IRS-Werte für den SSTR5. Zudem exprimierten die HL typischen Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen ausschließlich den SSTR2. Signifikante Rezeptorkombinationen wurden nicht beobachtet. Die Mehrzahl der Lymphome exprimierten alleinig den CXCR4, SSTR2 oder SSTR3. In extranodalem Gewebe wurde der SSTR3 vermehrt gefunden ($p = 0,038$), infradiaphragmale Läsionen zeigten eine Tendenz zur Expression des SSTR1 ($p = 0,082$). Weiterhin waren Tumorpräparate von Männer häufiger positiv für den CXCR4.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Rezeptor CXCR4 aufgrund seiner häufigen und intensiven Expression bei malignen Lymphomen als diagnostische und therapeutische Zielstruktur genutzt werden kann, was die aktuelle Forschungslage bestätigt. Im Kontrast dazu konnte die Expression der Somatostatinrezeptoren nicht einheitlich und in geringerer Intensivität beobachtet werden. Sie ist wahrscheinlich abhängig von histologischen Eigenschaften einzelner NHL-Subtypen, die weiterführend an größeren Patientenzahlen differenziert betrachtet werden sollten.

2 Einleitung

2.1 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome umfassen die Gesamtheit bösartiger Neoplasien, welche von Zellen des lymphatischen Systems ausgehen. Da Lymphozyten zu jedem Zeitpunkt ihrer Reifung entarten können, gibt es eine Vielzahl an Lymphomentitäten. Die grundlegende Einteilung maligner Lymphome beruht auf dem Vorhandensein oder Fehlen von so genannten Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen (HSR-Zellen). Dabei handelt es sich um neoplastische mehrkernige Riesenzellen. Bei Hodgkin-Lymphomen (HL) sind sie nachweisbar, bei Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) nicht (Vasef et al. 2000). Bei beiden Begriffen handelt es sich um historisch gewachsene Bezeichnungen für zwei Tumorentitäten, die sich in zahlreichen Gesichtspunkten, wie Pathogenese, Klinik, Prognose und Therapie unterscheiden (Jaffe et al. 2008). Deshalb werden beide Entitäten in den folgenden Abschnitten weitgehend separat vorgestellt.

2.1.1 Klassifikation

Hodgkin-Lymphom

Thomas Hodgkin veröffentlichte 1832 die erste Fallstudie an Patienten, in der er eine Erkrankung des lymphatischen Systems beschreibt. 30 Jahre später sollte diese Erkrankung durch Samuel Wilks nach ihm benannt werden (Hodgkin 1832, Wilks 1865).

Die moderne Klassifikation der HL wurde 1966 von Lukes und Butler veröffentlicht und im selben Jahr in der Rye-Konferenz in New York überarbeitet (Lukes et al. 1966a, Lukes et al. 1966b). Je nach histomorphologischem Bild und vorherrschender Zellart wurden vier Subtypen unterschieden: nodulär-sklerosierend, lymphozytenreich, gemischtzellig und lymphozytenarm. Nach fast 30 Jahren wurden die klassischen HL in der „*Revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms*“ (REAL) um die Hauptgruppe der nodulär-lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphome (NLPHL) erweitert (Harris et al. 1994) und erstmals gemeinsam mit der Gruppe der NHL veröffentlicht. In derselben Form sind die HL ebenfalls in die derzeit gültige WHO-Klassifikation übernommen worden (siehe Tabelle 1) (Dürkop et al. 2011).

Tabelle 1: WHO-Klassifikation des Hodgkin-Lymphoms (modifiziert nach Swerdlow et al. 2016)

Hodgkin-Lymphom
Noduläres lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom
Klassisches Hodgkin-Lymphom
<ul style="list-style-type: none"> - nodulär-sklerosierend - lymphozytenreich - gemischtzellig - lymphozytenarm

Non-Hodgkin-Lymphom

Für die NHL gab es aufgrund der Komplexität und Diversität lange keine einheitliche Klassifikation. Im Jahr 1966 publizierte Rappaport die erste moderne Klassifikation, die sich ausschließlich an morphologischen Kriterien orientierte. Darunter zählten das Wachstumsmuster (nodulär oder diffus), die Zellart (Lymphozyten, Histiozyten oder gemischt) und der Grad der Differenzierung (gut oder schlecht differenziert) (Rappaport 1966). Dies ermöglichte eine erste prognostische Beurteilung und verhalf zu einer besseren Ordnung und Systematik (Byrne 1977).

Zahlreiche neue bzw. überarbeitete Klassifikationen wurden infolge umfassender Forschung im Bereich der Biologie der Lymphozyten und aufgrund neuer Erkenntnisse in der Immunologie publiziert (Lennert 1969, Dorfman 1974, Lukes und Collins 1974). Dabei etablierte sich die Kiel-Klassifikation des Pathologen Karl Lennert im deutschsprachigen Europa (Lennert et al. 1975) und die „*Working Formulation*“ im englischsprachigen Raum und den USA (1982).

Die Tumorentitäten beider Klassifikationen waren teilweise nicht zweifelsfrei einander zuzuordnen, weshalb eine national übergreifende Vergleichbarkeit nahezu unmöglich war (Stein 2000). Daher gründeten 19 Pathologen und klinisch tätige Ärzte beider Kontinente in den 1990-er Jahren die „*International Lymphoma Study Group*“, um eine einheitliche Klassifikation zu etablieren. Es wurden Neuerkenntnisse in Bezug auf Morphologie, Zytologie, Klinik, Molekulargenetik und Immunphänotypen berücksichtigt und 1994 zusammen mit den HL in der REAL publiziert (Harris et al. 1994).

Im Jahr 2001 wurde schließlich die Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) publiziert und letztmals im Jahr 2016 überarbeitet (Hossfeld 2002, Swerdlow et al. 2016). Basierend auf allen vorangegangenen Klassifikationen existiert damit eine weltweit gültige und akzeptierte Einteilung für den klinischen Alltag (Stein 2000, Feller et al. 2011). Eine grobe Gliederung der NHL geschieht nach der WHO anhand der Zellart, aus der sich das

Malignom entwickelt. Dies können Vorläuferzellen der Lymphopoese, B-Zellen, T-Zellen oder Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sein. Zusätzlich werden die HL und lymphoproliferative Erkrankungen, die mit einer Transplantation assoziiert sind, in eigenständigen Kategorien aufgelistet (siehe Tabelle 2). Die verschiedenen Entitäten sind definiert nach histopathologischen, immunphänotypischen, molekularen und klinischen Besonderheiten. In naher Zukunft sind vor allem Fortschritte im Bereich der Molekulargenetik zu erwarten, wodurch neue Entitäten entstehen werden (Swerdlow 2013).

Tabelle 2: WHO-Klassifikation lymphatischer Neoplasien (modifiziert nach Dürkop et al. 2011)
 NK = Natürliche Killerzellen; MALT = Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe; NOS = nicht weiter spezifiziert

Vorläuferzellneoplasien	
- B-lymphoblastische(s) Leukämie/Lymphom	
- T-lymphoblastische(s) Leukämie/Lymphom	
- NK-Zell-lymphoblastische(s) Leukämie/Lymphom	
Reifzellige B-Zell-Neoplasien	
- Chronische lymphatische Leukämie/lymphozytisches Lymphom	- MALT-Lymphom
- Prolymphozytenleukämie vom B-Zell-Typ	- Nodales Marginalzonenlymphom
- Splenisches Marginalzonenlymphom	- Follikuläres Lymphom
- Haarzellenleukämie	- Primäres kutanes Follikelzentrumslymphom
- Lymphoplasmozytisches Lymphom	- Mantelzelllymphom
- Waldenström-Makroglobulinämie	- Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom
- Schwerkettenkrankheiten	- Burkitt-Lymphom
- Plasmazellmyelom	- B-Zell-Lymphom, NOS
- Solitäres Plasmozytom des Knochens	
- Extraossäres Plasmazytom	
Reifzellige T-Zell- und NK-Zell-Neoplasien	
- Prolymphozytenleukämie vom T-Zell-Typ	- Adulte(s) T-Zell-Leukämie/-Lymphom
- Großgranuläre T-lymphatische Leukämie	- Extranodales NK-/T-Zell-Lymphom, nasaler Typ
- Aggressive NK-Zell-Leukämie	- Enteropathie-assoziiertes T-Zell-Lymphom
- Systemische EBV-positive T-Zell-Lymphoproliferation des Kindesalters	- Hepatosplenisches T-Zell-Lymphom
- Hydra vakziniform-ähnliches Lymphom	- Primäres kutanes $\gamma\delta$ -T-Zell-Lymphom
	- Mycosis fungoides
	- Sézary-Syndrom

- Subkutanes Panniculitis-artiges T-Zell-Lymphom
- Primär kutane CD30-positive T-Zell-Lymphoproliferation
- Peripheres T-Zell-Lymphom
- Angioimmunoblastisches T-Zell-

Lymphom

- Anaplastisches großzelliges Lymphom
- T-Zell-Lymphom, NOS

Hodgkin-Lymphom

- Noduläres lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom
- Klassisches Hodgkin-Lymphom

Posttransplantationsassoziierte Lymphoproliferation (PTLD)

- Frühe Läsionen
- Polymorphe PTLD (B- und T-/NK-Zelltypen)
- Klassisches Hodgkin-Lymphom, PTLD-Typ

2.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

In Deutschland wurden im Jahr 2010 etwa 18.500 Neuerkrankungen an malignen Lymphomen erfasst, was insgesamt fast 4 % aller bösartigen Entartungen umfasst (Robert-Koch-Institut 2013a). Die Lymphom-Prävalenz in Europa liegt bei 6 bis 9 Fällen pro Jahr je 100.000 Einwohnern. Dabei entfallen 40 % auf Hodgkin-Lymphome und 60 % auf Non-Hodgkin-Lymphome (Böcker et al. 2012).

Hodgkin-Lymphome

Hodgkin Lymphome sind vergleichsweise selten. Im Jahr 2010 erkrankten daran in Deutschland 1.260 Männer und 940 Frauen, jedoch sind sie in Europa die häufigste maligne Erkrankung bei jungen Erwachsenen unter 20 Jahren. Dabei handelt es sich vor allem um die lymphozytenprädominante Form und die noduläre Sklerose. Charakteristisch ist die bimodale Altersinzidenz mit einem Gipfel bei 15- bis 35-Jährigen und einer zweiten Häufung zwischen 55 und 65 Jahren (Böcker et al. 2012, Robert-Koch-Institut 2013a).

Die genaue Ätiologie der HL ist bisher noch nicht geklärt. Weltweite geografische Unterschiede weisen darauf hin, dass Umgebungseinflüsse eine Rolle bei der Entstehung des HL spielen. So ist die Inzidenz bei Kindern in Entwicklungsländern höher und steigt in Ländern mit besserem sozio-ökonomischen Status erst bei Jugendlichen an (Gutensohn und Cole 1977).

Am Wahrscheinlichsten ist ein Zusammenhang zwischen dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und dem Auftreten eines HL. In fast der Hälfte der Fälle kann genomisches Material des EBV in

den entarteten Zellen nachgewiesen werden, wobei dies häufiger bei jungen Erwachsenen zu beobachten ist (Mueller und Grufferman 1999). Trotzdem erklärt die EBV-Infektion nicht den Peak der Inzidenz im Jugendalter, denn bei 30-jährigen liegt die EBV-Durchseuchungsrate ohnehin über 95 % (Swerdlow 2003). Weiterhin können Immundefekte durch eine immunsuppressive Therapie nach einer Transplantation oder durch Infektion mit dem HI-Virus die Entstehung eines HL begünstigen. Grufferman et al. (1977) fanden in ihrer Untersuchung ein 7-fach erhöhtes Risiko für Menschen, bei deren Geschwistern vor dem 45. Lebensjahr ein HL diagnostiziert worden war. Es kann also auch von genetischen Faktoren bei der Entstehung eines HL ausgegangen werden.

Non-Hodgkin-Lymphome

Im Jahr 2000 lag die Zahl der Neuerkrankungen an NHL in Deutschland noch bei 12.500. Zehn Jahre später waren es bereits 16.000 Neuerkrankungen. Insgesamt wird eine zunehmende Inzidenz mit dem Alter und ein mittleres Erkrankungsalter von 60 bis 70 Jahren beobachtet. In Europa entstehen die NHL zu ca. 85 % aus B-Lymphozyten, lediglich 15 % sind T- oder NK-zellulären Ursprungs. Lymphome im Kindesalter sind sehr selten, jedoch hochmaligne. Dazu zählen das lymphoblastische Lymphom, das Burkitt-Lymphom und das großzellig-anaplastische Lymphom (Böcker et al. 2012).

Mit jeweils 3,4 % steht in Deutschland das NHL bei Frauen an 9. und bei Männern an 8. Stelle der häufigsten Tumorerkrankungen. Dafür ist die Prognose mit einer 5-J-ÜLR mit 67 % generell gut (Robert-Koch-Institut 2013a).

HIV und Autoimmunerkrankungen erhöhen das Erkrankungsrisiko signifikant (Wang und Hartge 2010). Die Inzidenz bei AIDS-Patienten ist sogar bis zu 1000-fach erhöht. Außerdem gibt es Assoziationen zwischen dem Auftreten von NHL und einer Infektion mit EBV, HTLV-1, dem Hepatitis-C-Virus, dem humanen Herpes-Virus 8 und dem *Helicobacter pylori* (HP). Auch Gendefekte, wie beim Wiskott-Aldrich-Syndrom, Chromosomentranslokationen (t(8;14)(q24;q32)) bei Burkitt-Lymphomen oder t(11;14)(q13;q32) bei Mantelzelllymphomen spielen eine Rolle in der Pathogenese von NHL (Böcker et al. 2012, Herold 2013).

Trotz der hohen Heterogenität der einzelnen NHL werden sie in Krebsstatistiken häufig unter einer Entität subsummiert, was das Verständnis der Ätiologie und Möglichkeiten der Prävention kleinerer Subtypen kompliziert (Skrabek et al. 2013). Obwohl einige der Erkrankungen auf bestimmte Risikofaktoren zurückzuführen sind, bleibt die Ursache in den meisten Fällen unklar und kann nur in 2 von 10 Fällen einem bestimmten Faktor zugeordnet werden (Hartge und Devesa 1992).

2.1.3 Pathologie

Hodgkin-Lymphome

Histologisch gekennzeichnet werden die Hodgkin-Lymphome durch die HSR-Zellen. Hierbei handelt es sich um große Blasten und mehrkernige Riesenzellen monoklonalen Ursprungs (siehe Abbildung 1). Sie stellen die eigentlichen neoplastischen Zellen dar. Sie machen allerdings nur etwa 1 % des gesamten Zellbildes aus. Den Rest bildet ein entzündliches Infiltrat u. a. aus Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, Mastzellen und Histiozyten (Küppers et al. 2012).

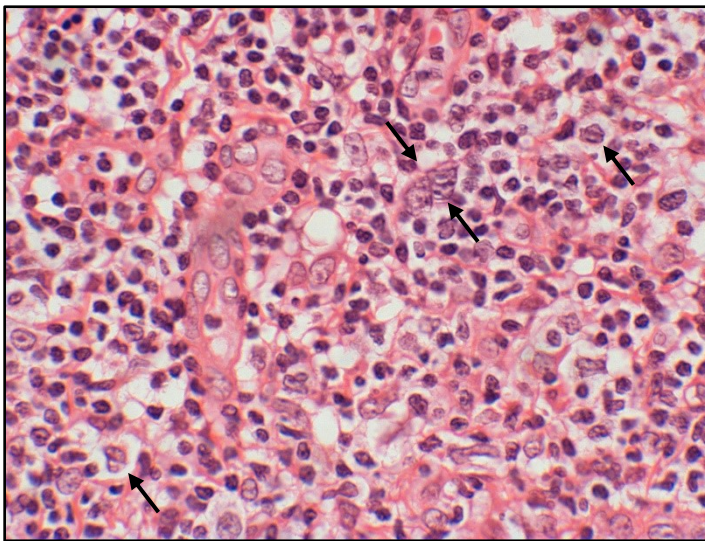


Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Originalvergrößerung: 630-fach. Hodgkin-Lymphom mit mehrkernigen Hodgkin- und Sternberg-Reed-Zellen (Pfeile)

Die 4 Subtypen des klassischen HL lassen sich anhand der Anzahl von HSR-Zellen, Zellinfiltrat, Wachstumsmuster und Alter der Patienten unterscheiden (siehe Tabelle 3).

Die klassischen HL sind immunhistochemisch durch die Oberflächenmerkmale CD30 und teilweise CD15 charakterisiert. Bei nodulär lymphozytenprädominanten Hodgkin-Lymphomen (NLPHL) fehlen diese. Charakteristisch für das NLPHL sind dafür bestimmte B-Zell-Antigene (z. B. CD20, CD79a). Das Infiltrat ist anhand kleiner knotenbildender Lymphozyten erkennbar und besitzt nur vereinzelt Riesenzellen mit kleinen Nukleolen, die als „*lymphocyte predominant cells*“ (LP-Zellen) oder Popcorn-Zellen bezeichnet werden (Böcker et al. 2012).

Tabelle 3: Typen des Hodgkin-Lymphoms (modifiziert nach Böcker et al. 2012)

LP-Zellen = Lymphozytenprädominante Zellen; NLPHL = nodulär lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom; J = Jahre; HSR = Hodgkin-Sternberg-Reed-Zellen

Hodgkin-Subtyp	Zusammensetzung des Infiltrats					Bevorzugte Lymphknotenregion	Bevorzugtes Alter
	HSR-Zellen	Lymphozyten	Neutrophile	Eosinophile	Nekrosen		
NLPHL	+ (atypische LP-Zellen)	+++++		(+)		zervikal	30 – 60 J
nodulär-sklerosierend	++	++	+	+	+	mediastinal supraklavikulär	15 – 30 J
gemischt-zellig	+++	+++	+	+		zervikal und abdominal	30 – 60 J
lymphozytenreich	++	+++				periphere Lymphknoten	30 – 60 J
lymphozytenarm	++++	+				abdominal	60 – 70 J

Non-Hodgkin-Lymphome

Alle malignen Lymphome, die keine HSR-Zellen aufweisen, werden den Non-Hodgkin-Lymphomen zugeordnet. Die WHO unterscheidet derzeit zwischen mehr als 50 verschiedenen Subtypen, die klinisch, epidemiologisch und pathologisch eine breite Heterogenität zeigen. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit nur auf einige, in Hinblick auf häufige Entitäten und auf die verwendeten Proben wichtige Unterformen näher Bezug genommen.

Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (DLBCL)

Mit einer Häufigkeit von 30 – 40 % ist das großzellige B-Zell-Lymphom die größte Gruppe der NHL. Die DLBCL fassen eine sehr heterogene Gruppe an Erkrankungen zusammen, die sich zytomorphologisch und histopathologisch unterscheidet. Mittlerweise differenziert die WHO verschiedene Subtypen und Entitäten, die sich in Zukunft wahrscheinlich noch weiter abgrenzen werden. So wurde erst in der überarbeiteten Version der WHO von 2016 die provisorische Gruppe des DLBCL mit IRF4-Rearrangement neu hinzugefügt (Swerdlow et al. 2016). Seit der Klassifikation im Jahr 2008 werden zwei molekulare Subtypen des DLBCL unterschieden: das DLBCL vom aktivierten B-Zell-Typ und das DLBCL vom Keimzentrumstyp, wobei letzterer mit einem besseren therapeutischen Outcome verbunden ist (Monti et al. 2005, Ott et al. 2010). Histologisch betrachtet werden die großzelligen B-Zell-Lymphome nach dem vorherrschenden Zelltyp aus Zentrozyten oder Immunoblasten unterschieden. Immunoblasten entstehen aus extrafollikulären B-Zell-Blasten. Es sind große

Zellen mit rundlich-ovalem Kern und basophilem Zytoplasma. Zentroblasten entstehen aus blastischen Keimzentrumszellen mit runden Zellkernen, heller Chromatinstruktur und randständigen Nukleolen (Böcker et al. 2012). Zusätzlich gibt es verschiedene Untergruppen, die in Zusammenhang mit bestimmten klinischen Gesichtspunkten auftreten, wie zum Beispiel das EBV- und HHV8⁺-assoziierte DLBCL, das primäre DLBCL des Zentralnervensystems und das DLBCL bei chronischer Entzündung (Dürkop et al. 2011).

Folikuläres Lymphom

Etwa ein Viertel der NHL sind der Gruppe des follikulären Lymphoms zuzuordnen. Sie entstehen aus Keimzentrumszellen der Sekundärfollikel und bestehen aus neoplastischen Zentrozyten und Zentroblasten sowie aus nicht-neoplastischen follikulären dendritischen Zellen und T-Zellen. Diese Lymphome sind durch ein follikuläres Wachstumsmuster gekennzeichnet, wobei ein Drittel der Betroffenen außerdem diffuse Bereiche zeigt (Campo et al. 2011, Böcker et al. 2012).

Folikuläre Lymphome haben meist einen indolenten Verlauf und müssen daher nicht immer sofort behandelt werden. In 25 % der Fälle kommt es zu einer spontanen Regression. Allerdings ist im längeren Verlauf auch die Umwandlung in ein sekundäres aggressives NHL möglich. Meist gelingt die Diagnose erst in einem fortgeschrittenen Stadium.

Sehr häufig (> 90 %) sind follikuläre Lymphome mit der Translokation t(14;18) verbunden, was eine genetische Umlagerung und eine Überexpression des bcl2-Proteins zur Folge hat. Dieses Protein hat anti-apoptotische Funktionen und fördert damit das Wachstum des Tumors. Auch bei Mantelzelllymphomen und dem Burkitt-Lymphom ist diese Translokation nicht selten (Böcker et al. 2012).

Chronische Lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ (B-CLL)

Bei der B-CLL handelt es sich nach der WHO-Klassifikation um ein indolentes B-Zell-Lymphom mit lymphozytärer Leukozytose. Im Blutaussstrich befindet sich ein großer Anteil kleiner, reifer Lymphozyten. Betroffene Lymphknoten weisen eine aufgelockerte Struktur auf und zeigen eine Proliferation kleiner neoplastischer Lymphozyten. Größere lymphatische Zellen, wie z.B. die Prolymphozyten, bilden Pseudofollikel oder kommen diffus im Lymphknoten vor (Hallek et al. 2002, Böcker et al. 2012). Immunphänotypisch sind bei den B-CLL membranständige IgM, B-Zell-spezifische Antigene (CD19, CD20, CD79a) sowie CD5, CD23 und CD43 zu finden. Eine CD10-Expression liegt nicht vor. Gehäuft ist aber das gemeinsame Auftreten von B-CLL mit einer Trisomie 21 oder der 13q-Deletion (Hallek et al.

2002). Für die CLL wird in Europa die Stadieneinteilung nach Binet genutzt (siehe Tabelle 4). Sie beruht allein auf den Ergebnissen einer körperlichen Untersuchung und einer Blutanalyse und ermöglicht eine prognostische Aussage (Binet et al. 1981).

Die B-CLL kann lange ohne Symptome verlaufen und äußert sich meist erst im fortgeschrittenen Stadium mit schmerzlosen Lymphknotenschwellungen, Schwäche und Infektanfälligkeit (Herold 2013).

Tabelle 4: CLL-Stadieneinteilung nach Binet (modifiziert nach Binet et al. 1981)

LK = Lymphknoten; zu den betroffenen Regionen zählen zervikale, axilläre, inguinale LK-Vergrößerungen (unilateral oder bilateral) sowie Leber- und Milzvergrößerungen

Stadium	Definition	Medianes Überleben
A	Hämoglobin ≥ 10 g / dl Thrombozyten $\geq 100.000 / \mu\text{l}$ < 3 betroffene Regionen (LK, Leber oder Milz)	> 10 Jahre
B	Hämoglobin ≥ 10 g / dl Thrombozyten $\geq 100.000 / \mu\text{l}$ ≥ 3 betroffene Regionen (LK, Leber oder Milz)	5 Jahre
C	Hämoglobin < 10 g / dl Thrombozyten < 100.000 / μl	2 – 3 Jahre

Marginalzonenlymphom (MZL)

Je nach Entstehungsort unterscheidet die „*International Lymphoma Study Group*“ drei Entitäten: extranodales MZL des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (MALT), nodales MZL und splenisches MZL (Harris et al. 1994).

Neben einer gemeinsamen Ursprungszelle und Ähnlichkeiten bezüglich einer möglichen Entstehung durch mikrobielle Pathogene oder Autoantigene unterscheiden sich die Subtypen in ihrer Klinik. MZL des MALT und der Milz werden zu den indolenten NHL gezählt. Die Patienten sind meist gut leistungsfähig, ohne B-Symptome und weisen eine hohe Überlebensrate auf. Hingegen zeigen Patienten mit nodalem MZL einen aggressiveren Verlauf und haben eine kürzere Überlebensrate (Thieblemont 2005).

Das nodale MZL manifestiert sich bevorzugt in den Lymphknotenregionen des Halses. Gleichzeitig können extranodale MZL des MALT-Typs auch andere Gewebe, wie das des Magens, der Speicheldrüsen, der Schilddrüse oder des Waldeyerschen Rachenrings befallen (Böcker et al. 2012).

MZL sind gekennzeichnet durch Zellen mit kleinen bis mittelgroßen Kernen und relativ breitem Zytoplasma. Sie entstehen in der nodalen oder extranodalen Marginalzone und sind durch die Fähigkeit gekennzeichnet, außerhalb von lymphatischem Gewebe

proliferationsfähig zu sein. Die Tumorzellen sind mit vereinzelt auffindbaren Blasten vermischt. Zunächst breiten sie sich im Sinus des Lymphknotens aus, durchbrechen aber im Verlauf der Erkrankung die Sinuswände und beginnen den Lymphknoten diffus zu infiltrieren. In der Milz ist vorzugsweise die weiße Pulpa betroffen (Böcker et al. 2012, Herold 2013).

NHL dieser Entität sind häufig mit Autoimmunerkrankungen (z. B. Sjögren-Syndrom, Hashimoto-Thyreoiditis) assoziiert. Eine chronische Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* kann ebenfalls ein MALT-Lymphom auslösen. Oft genügt in diesen Fällen eine Eradikationstherapie, wodurch sich das Lymphom spontan zurückbildet. Weiterhin werden auch *Campylobacter jejuni*, Chlamydien oder *Borrelia burgdorferi* mit der Entstehung von MZL in Verbindung gebracht (Herold 2013).

Mantelzelllymphom (MCL)

Das MCL macht nur einen Anteil von fünf Prozent aller NHL aus, ist jedoch das Lymphom mit der ungünstigsten Langzeitprognose – die mediane Überlebenszeit liegt unter drei Jahren. Meist wird es erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, wenn bereits das Knochenmark infiltriert ist. Ein extranodaler Befall wird bei dieser Entität häufig beobachtet (Herold 2013). Histologisch wird das MCL als niedrig-maligne (indolent) klassifiziert, zeigt aber klinisch häufig einen aggressiven Verlauf. Pathognomonisch ist die Translokation t(11;14) mit daraus folgender Überexpression von Cyclin-D1, einem Regulator des Zellzyklus, der in normalen Lymphozyten nicht exprimiert wird. Zur Abgrenzung anderer Lymphomsubtypen ist der Nachweis dieser Translokation mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) obligat (Dreyling et al. 2016). Typisch ist auch die Koexpression von B-Zellmarkern mit CD5. Der Tumor nimmt seinen Ursprung in der Mantelzone des Follikels, was ihm seinen Namen gegeben hat. Das mikroskopische Bild wird durch eine knotige Ansammlung zentrozytenähnlicher Zellen bestimmt (Böcker et al. 2012).

Die WHO differenziert zwei Typen von klinisch indolenten Entitäten (Jares et al. 2012). Das klassische MCL weist üblicherweise nichtmutierte oder minimal mutierte IGHV (immunoglobulin heavy chain variable region)-B-Zellen auf, die normalerweise SOX11 exprimieren und typischerweise Lymphknoten und extranodale Regionen befallen. Durch zusätzliche molekulare und zytogenetische Anomalien können aggressivere blastoide oder pleomorphe MCL entstehen. Eine weitere Gruppe der MCL entwickelt sich aus IGHV-mutierten SOX11-B-Zellen. Dabei kommt es zu einem leukämischen nicht-nodalen Befall von Blut, Knochenmark und Milz. Diese Fälle sind klinisch häufig indolent. Allerdings

können sekundäre Mutationen (z. B. TP53) auftreten und zu einem aggressiven Verlauf führen (siehe Abbildung 2).

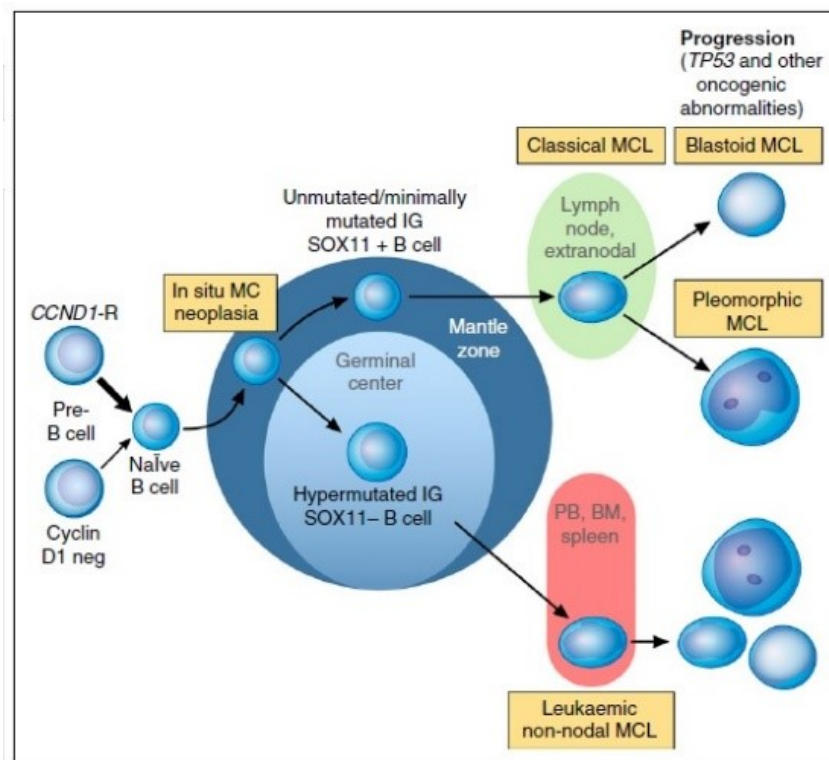


Abbildung 2: Modell der molekularen Pathogenese und Progression der MCL-Subtypen (nach Swerdlow 2016)

PB = peripheres Blut; BM = *bone marrow*, Knochenmark; IG = Immunglobulin; MCL = Mantelzelllymphom

2.1.4 Klinik und Diagnose

Hodgkin-Lymphome

Neben unspezifischen Allgemeinsymptomen, wie B-Symptomatik, Leistungsminderung und Juckreiz, lassen sich in der Mehrzahl der Fälle (80 bis 90 %) schmerzlose Lymphknotenvergrößerungen zum Zeitpunkt der Diagnose nachweisen. Diese Lymphknoten befinden sich zu 70 % peripher und stammnah (zervikal, inguinal, axillär). Mediastinale Lymphknoten sind selten (30 %), isolierte abdominale Lymphknoten sehr selten (5 %) vergrößert (Herold 2013). In vereinzelt Fällen kommt es zu einem Schmerz der Lymphknoten nach Alkoholkonsum, was nahezu pathognomonisch für das HL ist. Bei rund einem Fünftel der Patienten kann eine sekundäre Hepato- oder Splenomegalie beobachtet werden. Weiterhin kann es zu neurologischen Veränderungen, endokrinen Störungen, Skelett- und Lungenmanifestationen und zum Befall des Urogenitaltraktes kommen. Im Labor sind

eine absolute Lymphozytopenie sowie eine BSG-Erhöhung charakteristisch (Herold 2013). Der Diagnoseverdacht lässt sich anhand von Anamnese und klinischer Untersuchung stellen. In jedem Fall muss eine Exzision und Biopsie eines verdächtigen Lymphknotens die Diagnose sichern, um eine stadiengerechte Therapie und prognostische Aussage zu ermöglichen (Sasse und Engert 2013).

Non-Hodgkin-Lymphome

Ähnlich wie bei den HL kommt es auch bei NHL oft zu einer schmerzlosen Lymphknotenvergrößerung, B-Symptomen und Leistungsminderung. Möglich sind auch eine Splenomegalie, eine Anämie, Blutungen und Infekte durch Verdrängung des Knochenmarks. Je nach Art des Lymphoms können Klinik und Verlauf unterschiedlich sein. Extranodale Manifestationen der Leber, der Knochen oder der Haut kommen insbesondere bei kutanen T-Zell-Lymphomen (z. B. Mycosis fungoides, Sézary-Syndrom) vor. Auch bei den NHL ist die Histologie vergrößerter Lymphknoten, von anderen verdächtigen Geweben oder eine Knochenmarksbiopsie von zentraler Bedeutung. In der Immunhistochemie sind zahlreiche Oberflächenmarker nachweisbar. Vor allem die Marker CD20 (positiv bei B-Zell-Lymphomen) und CD3 (positiv bei T-Zell-Lymphomen) sind hilfreich bei der Unterscheidung von B- und T-Zell-Lymphomen. Verschiedene Lymphom-Entitäten exprimieren zum Teil bestimmte immunphänotypische Oberflächenmerkmale oder treten gehäuft im Zusammenhang mit genetischen Veränderungen auf (siehe Tabelle 5). Die Berücksichtigung dieser und anderer molekularer Eigenschaften verhilft zu einer besseren Zuordnung.

Nach Diagnosestellung können bildgebende Verfahren wie Röntgen-Thorax-Aufnahmen, CT-Untersuchungen und ggf. eine PET-CT zum Staging dienen und zu einer besseren prognostischen Aussage verhelfen (Herold 2013).

Tabelle 5: Immunphänotyp und häufige chromosomale Veränderungen bei NHL
 B-CLL = chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ; LPL = lymphoplasmozytisches Lymphom

Lymphom-Typ	Immunphänotyp					Chromosomale Veränderungen
	CD20	CD5	CD23	CD10	CD103	
B-CLL	+	+	+	+		Trisomie 12, 13q
Haarzellenleukämie	+				+	Uncharakteristisch
LPL	+	/+	/+	/+		Trisomie 12
Follikuläres Lymphom	+					t(14;18)
Mantelzelllymphom	+	+				t(11;14)
Marginalzonenlymphom	+	-				Trisomie 3

2.1.5 Klinische Stadien und Prognose

Hodkgin-Lymphome

Die Stadien-Einteilung wurde 1966 von einem Komitee internationaler Experten entwickelt und nach der Stadt Ann Arbor, Michigan, benannt (Rosenberg 1966). Die Ann-Arbor-Klassifikation wurde ursprünglich für HL entwickelt, wird aber in leicht erweiterter Form auch für die NHL angewandt. Die vier Hauptstadien (siehe Tabelle 6) unterscheiden den Ausbreitungsgrad, der große prognostische Bedeutung hat. Bei Grad I ist nur eine Lymphknotenregion (LKR) oder ein extranodaler Herd betroffen. Sind mehrere oder eine LKR und ein extranodaler Herd auf einer Seite des Zwerchfells beteiligt, wird die Erkrankung dem Grad II zugeordnet. Grad III ist charakterisiert durch den Befall mehrere LKR oder extranodale Herde auf beiden Zwerchfellseiten. Beim höchsten Grad IV liegt ein disseminierter Befall extralymphatischer Organe vor. Lymphknoten müssen nicht zwingend befallen sein. Die Stadien können weitere Zusätze erhalten. Ein "E" steht für einen extranodalen Befall, "S" bezeichnet einen Befall der Milz, "X" eine „Bulky disease“ (größere Tumormasse > 10 cm) und "A" das Fehlen bzw. "B" das Vorliegen von B-Symptomen (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust). Patienten mit B-Symptomatik haben generell eine schlechtere Prognose. Weiterhin verschlechtert ein hohes Alter, männliches Geschlecht, Tumoren mit einem Durchmesser über 10 cm, mehr als drei befallene LKR, eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), eine Anämie und ein niedriger Albuminserumgehalt die Prognose der Patienten (Herold 2013).

Das NLPHL ist mit einer 5-J-ÜR von 95 % die prognostisch günstigste Form; bei den klassischen HL liegt die erkrankungsfreie 5-J-ÜR zwischen 70 und 80 % (Böcker et al. 2012).

Tabelle 6: Stadieneinteilung des Hodgkin-Lymphoms nach der Ann-Arbor-Klassifikation (modifiziert nach Böcker et al. 2012)

Stadium	Befallsmuster der Lymphknoten
Stadium I	Befall einer Lymphknotenregion oder einer extralymphatischen Lokalisation
Stadium II	Befall von zwei benachbarten Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells, zusätzlicher Befall einer extralymphatischen Lokalisation
Stadium III	Befall von Lymphknotenstationen oder extralymphatischen Lokalisationen ober- und unterhalb des Zwerchfells
Stadium IV	Disseminierter extralymphatischer Befall mit oder ohne Lymphknotenbefall

Non-Hodgkin-Lymphome

Die Stadieneinteilung der NHL entspricht überwiegend der Einteilung der HL. Lediglich die CLL (siehe Tabelle 4) und das Multiple Myelom besitzen eigene Klassifikationen. Bei den NHL wird in der Ann-Arbor-Klassifikation zusätzlich zwischen primär nodalem und extranodalem Befall unterschieden, mit den Zusatzbezeichnungen N (nodal) und E (extranodal). Extranodale NHL sind seltener und können unter anderem im Gastrointestinaltrakt (MALT-Lymphome) oder der Haut (kutane T-Zell-Lymphome) vorkommen (Herold 2013). In der Praxis bewährte sich zusätzlich die Einteilung der NHL in indolent und aggressiv. Indolente NHL stellen mit 70 % den weitaus größeren Anteil dar, verlaufen langsam progredient und sind niedrig maligne. Therapeutische Maßnahmen müssen in der Regel erst bei Auftreten von Symptomen ergriffen werden (Böcker et al. 2012). Das häufigste indolente NHL ist das follikuläre Lymphom. Seltenerer Vertreter sind das Lymphoplasmazytische Lymphom, der M. Waldenström, das Marginalzonenlymphom und Mantelzelllymphom sowie die Haarzelleukämie und die chronische lymphatische Leukämie (Seiler et al. 2016). Im Gegensatz dazu sind die aggressiven NHL rasch progredient und führen unbehandelt schnell zum Tod (Herold 2013). Sie entwickeln sich überwiegend aus Blasten und zeigen eine hohe Proliferationsrate. Dieser Gruppe werden unter anderem die großzelligen B-Zell-Lymphome und das Burkitt-Lymphom zugeordnet. Klinische Risikofaktoren mit Prognoseverschlechterung werden nach dem International Prognostic Index (IPI) bewertet (siehe Tabelle 7). Dazu zählen ein hohes Alter (> 60 Jahre), ein schlechter Allgemeinzustand (berechnet nach dem WHO Performance Status), ein erhöhter LDH-Wert, ein Stadium III oder IV und ein extranodaler Befall (Shipp et al. 1993).

Tabelle 7: International Prognostic Index (IPI) für NHL (modifiziert nach Shipp et al. 1993)
WHO = Weltgesundheitsorganisation; ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group

Risikofaktor	Vorhanden, wenn:
Alter	> 60 Jahre
Performance Status (WHO/ECOG)	2-4
Laktatdehydrogenase-Wert	erhöht
Extranodaler Befall	> 1 extranodaler Befall
Stadium (Ann Arbor)	III-IV
Risikogruppe	Anzahl an Risikofaktoren
Niedrig	0-1
niedrig-intermediär	2
hoch-intermediär	3
Hoch	4-5

2.1.6 Therapie

Hodgkin-Lymphome

Die initiale Behandlungsstrategie richtet sich nach der Histologie, dem Krankheitsstadium und dem Vorhandensein oder Fehlen von Risikofaktoren (RF). Dazu werden 3 Prognosegruppen unterschieden: lokalisiertes, intermediäres und fortgeschrittenes Stadium. Patienten mit einem lokalisiertem Stadium (IA – IIB ohne RF) profitieren von einer kombinierten Therapie aus Chemotherapie und Involved-Field-Radiotherapie (IF-RT) (Ansell 2015). Mehrere Studien der GHSG (Deutsche Hodgkin-Lymphom-Studiengruppe) bestätigen den Vorteil einer Radio-Chemotherapie gegenüber einer alleinigen Bestrahlung und die Überlegenheit von zwei Zyklen ABVD (Adriamycin, Bleomycin, Vinblastin, Dacarbazin) und anschließender 20-Gy-IF-RT gegenüber vier Zyklen und höherer Bestrahlung (Engert et al. 2007, Engert et al. 2010). Auch Patienten der intermediären Gruppe (IA – IIB mit RF) werden mit einer Radio-Chemotherapie behandelt. Die in Bezug auf die Rückfallrate optimale Therapie konnte mit Hilfe der HD14-Studie eruiert werden, weshalb seit 2010 die aktuelle Standardtherapie bestehend aus zwei Zyklen BEACOPP eskaliert (Bleomycin, Etoposid, Adriamycin, Cyclophosphamid, Oncovin, Procarbacin, Prednison, eskaliert mit G-CSF ab Tag 8) und zwei Zyklen ABVD, gefolgt von 30 Gy IF-RT festgelegt wurde (von Tresckow et al. 2012). Bei allen weiter fortgeschrittenen Stadien (ab IIB mit RF und Bulky disease und/oder extranodalem Befall) erhalten die Patienten eine erweiterte Chemotherapie (sechs Zyklen BEACOPP eskaliert) und bei PET-positiven Residuen eine Radiotherapie von 30 Gy (Engert et al. 2012).

Weitere Behandlungsoptionen sind eine palliative Chemotherapie, die Behandlung mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren, die Durchführung einer Stammzelltransplantation oder die Teilnahme an klinischen Studien, in denen neue Wirkstoffe getestet werden (Ansell 2015).

Non-Hodgkin-Lymphome

Durch die große Heterogenität der einzelnen NHL-Gruppen, sind auch deren Therapieprotokolle verschieden und unter anderem abhängig von dem Malignitätsgrad, der Histologie, dem Grading, dem Alter und dem Allgemeinzustand des Patienten.

Hochmaligne Lymphome weisen aufgrund ihrer hohen Zellteilungsrate ein rasches Tumorwachstum auf. Sie sind allerdings strahlen- und zytostatikasensibler als die langsam fortschreitenden indolenten NHL. Als Standard wird deswegen für hochmaligne NHL in jedem Stadium eine Chemotherapie nach dem CHOP-Schema (Zytostatika-Kombination aus

Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison) eingesetzt, die ggf. um den Antikörper Rituximab (R-CHOP) oder um die Substanz Etoposid (CHOEP) ergänzt werden kann. Eine Therapie mit dem CD20-Antikörper Rituximab ist nur bei B-Zell-NHL mit CD20-Expression möglich. An die Kombinationschemotherapie kann ebenfalls eine Strahlentherapie angeschlossen werden (siehe Tabelle 8). In frühen Stadien bildet sich die Erkrankung dadurch in fast allen Fällen zurück; in fortgeschrittenen Stadien (III – IV) bei rund 60 % (Hahn 2013). Da indolente NHL meist über viele Jahre einen nicht-aggressiven Verlauf zeigen, ist bei symptomlosen Erkrankungen ein sofortiger Therapiebeginn nicht zwingend notwendig. Grundsätzlich werden niedrigmaligne NHL im Stadium I und II bestrahlt und können dadurch meist kurativ behandelt werden. In fortgeschrittenen Stadien ist häufig nur noch eine palliative Therapie möglich. Bei rascher Progression, Metastasierung oder belastenden Symptomen wird dann, wenn möglich, mit einer Immun-Chemotherapie begonnen (Hahn 2013).

Tabelle 8: Therapie der Non-Hodgkin-Lymphome (modifiziert nach Hahn 2013)

R-CHOP = Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin (= Hydroxy-Daunorubicin), Vincristin (= Oncovin®), Prednisolon

Stadium	Therapieverfahren
Niedrigmaligne NHL	
I und II	Bestrahlung
III und IV	Bei rascher Progression, Knochenmarksbeteiligung mit Zytopenie, B-Symptomen, Beschwerden bei großen Lymphknoten oder Splenomegalie, ausgeprägter Paraproteinämie: Immunchemotherapie: meist R-CHOP. Ansonsten „watch and wait“
Hochmaligne NHL	
I bis IV	Immun-Chemotherapie (Standard: R-CHOP), evtl. anschließende Bestrahlung. Patienten < 60 Jahre mit hohem Risiko: evtl. Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation

Bei einigen NHL werden spezielle Therapieansätze verfolgt. Beispielsweise ist bei einem primär zerebralen Lymphom eine CHOP-Therapie unwirksam. Hier kommt eine intrathekale Behandlung mit Dexamethason und Methotrexat in Betracht. Auch die CLL, das Multiple Myelom und der Morbus Waldenström besitzen vom Standard abweichende Therapiepläne (Herold 2013).

2.2 Somatostatinrezeptoren

2.2.1 Somatostatin

Somatostatin (SST) ist ein inhibitorisches Polypeptidhormon, welches erstmals im Jahr 1972 aus dem Hypothalamus von Schafen isoliert wurde (Brazeau et al. 1973). Durch intensive Forschung konnte herausgefunden werden, dass SST nicht nur im Hypothalamus, sondern auch in Zellen des Immunsystems, des zentralen und peripheren Nervensystems, des Gastrointestinaltraktes, des Pankreas, der Schilddrüse, der Nieren und der Nebennieren produziert wird (Srikant et al. 1992, Mundschenk et al. 2003).

Beim Menschen kommt das Somatostatin in zwei aktiven Formen vor: Somatostatin-14 und Somatostatin-28, die sich in ihrer Anzahl der Aminosäuren unterscheiden (Reisine 1995). Durch Konvertasen werden beide Subtypen aus dem 116 Aminosäuren umfassenden Präprosomatostatin abgespalten (Goodman et al. 1983).

SST besitzt viele biologische Funktionen, die es über eine Hemmung der Freisetzung von Wachstumshormonen (Somatotropin, Insulin-like growth factor-1, Epidermal-Growth-Factor), Schilddrüsenhormonen (Thyreoidea-stimulierendes Hormon), gastrointestinale Hormonen (Gastrin, Sekretin, Cholezystokinin, Pepsin), Pankreashormonen (Insulin, Glukagon) und Neuropeptide (Thyreotropin-releasing Hormon, Corticotropin-releasing Hormon) vermittelt (Patel 1999). Weiterhin moduliert SST die Geschwindigkeit der Magenentleerung und der Darmpassage, indem es die Kontraktilität des Magen-Darm-Trakts und der Gallenblase herabsetzt. Außerdem reduziert es die Ausschüttung von Zytokinen wie IL-6 und IFN- γ (Prasad et al. 2007). Der hemmende Effekt auf die Proliferation von gesunden und malignen Zellen macht es zudem zu einem wichtigen pharmakologischen Target (Bousquet et al. 2001).

2.2.2 Somatostatinrezeptoren

Die Wirkung von Somatostatin wird über die Bindung an sechs verschiedene Rezeptoren (SSTR) vermittelt: SSTR1, SSTR2A, SSTR2B, SSTR3, SSTR4 und SSTR5. Bei den Rezeptoren SSTR2A und SSTR2B handelt es sich um verschiedene Spleißvarianten des SSTR2-Gens, wobei beim Menschen bisher lediglich der SSTR2A nachgewiesen werden konnte (Patel und Srikant 1997). Zur Vereinfachung wird der SSTR2A im Folgenden nur als SSTR2 bezeichnet.

Die Gene für die Subtypen liegen auf unterschiedlichen Chromosomen, was auf verschiedene

Funktionen in den jeweiligen Geweben schließen lässt (Taniyama et al. 2005).

Alle SSTR gehören zu der Proteinsuperfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen. Das extrazelluläre N-terminale Ende bindet einen spezifischen Liganden, wodurch im Inneren der Zelle am C-terminalen Ende Guanosin triphosphat-bindende Proteine (G-Proteine) aktiviert werden. Jeder SSTR-Subtyp ist mit einem oder mehreren G-Proteinen gekoppelt und löst dadurch verschiedene spezifische intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden in der Zelle aus (Patel 1999, Fischer et al. 2008).

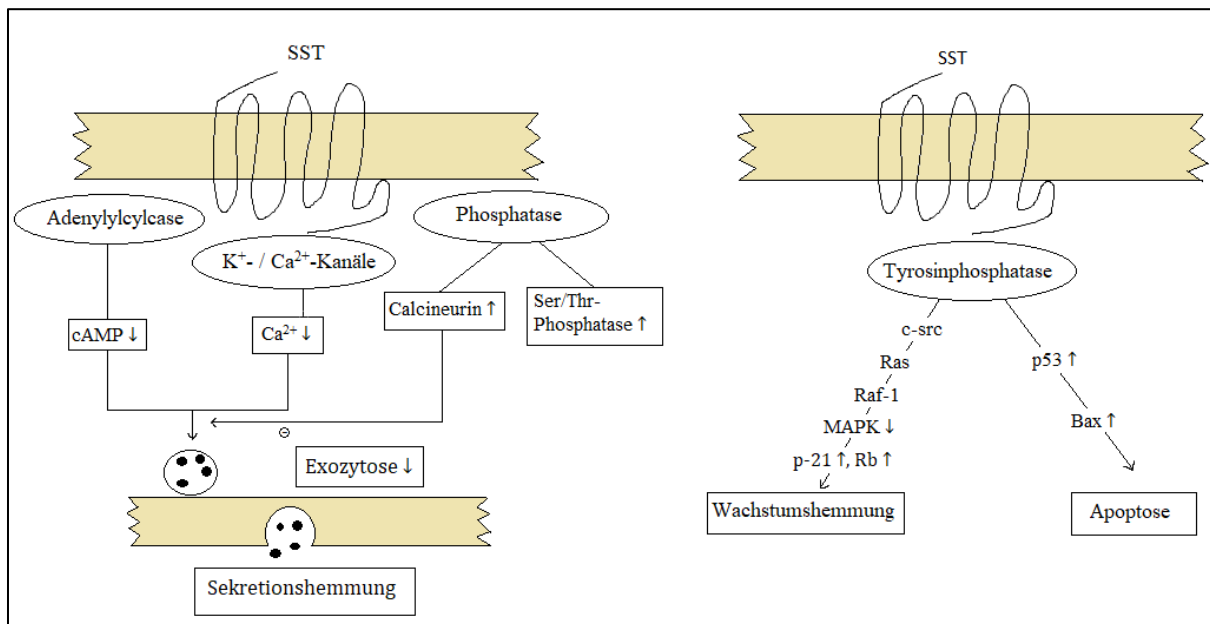


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege von Somatostatinrezeptoren modifiziert nach Patel et al. 1999

SST = Somatostatin; cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat; MAPK = Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Kaskade; Rb = Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein

Alle Subtypen sind über inhibitorische G_i-Proteine funktionell mit der Adenylylcyclase verbunden. Die Bindung von Somatostatin an seinen Rezeptor führt zur Hemmung der Adenylylcyclase, was in einer Abnahme von intrazellulärem cAMP resultiert und in der Zelle die Exozytose intrazellulärer Vesikel inhibiert (Patel et al. 1994). Mitunter sind die SSTR über G-Proteine an Ionenkanäle gekoppelt. Ihre Aktivierung beeinflusst die Öffnungswahrscheinlichkeit von K⁺- und Ca²⁺-Kanälen und führt zu einer Abnahme von intrazellulärem Ca²⁺. Wie aus der Abbildung 3 ersichtlich wird, führt diese Konzentrationsänderung zu einer Sekretionshemmung der Zelle (Lamberts et al. 1996). Die Bindung von Somatostatin an den SSTR1 und an den SSTR2 bewirkt ebenfalls die Aktivierung der Tyrosinphosphatase, was über weitere Signalkaskaden eine antimitotische

Wirkung zur Folge hat (Lamberts et al. 1996). Darüber hinaus induziert der SSTR3 eine selektive Apoptose der Zelle (Bousquet et al. 2001).

Die SSTR kommen in diversen Geweben vor. Sie konnten bisher in der Hypophyse, dem Zerebellum, den Speicheldrüsen, der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, den Blutgefäßen, den Lymphozyten, den Monozyten, den Makrophagen, der Milz, dem Duodenum, dem Ileum, dem Kolon, dem Pankreas, den Hoden und den Eierstöcken nachgewiesen werden (Prasad et al. 2007). Teilweise kommen verschiedene Subtypen im gleichen Gewebe vor (Reisine und Bell 1995, Mundschenk et al. 2003). Den Rezeptorsubtyp SSTR2 fanden Reubi und Kollegen vor allem in Gefäßen, in Nervenzellen, im Nebennierenmark, in den Pankreasinseln und in der Milz (Reubi et al. 2001). Auch in Hinsicht auf die Lokalisation innerhalb der Zellen unterscheiden sich die Rezeptoren. Der SSTR2 befindet sich überwiegend an der Zellmembran. Der SSTR1, der SSTR3, der SSTR4 und der SSTR5 kommen hauptsächlich intrazellulär vor (Reubi et al. 1998, Hofland et al. 1999, Kulaksiz et al. 2002).

2.2.3 Bedeutung der Somatostatinrezeptoren bei malignen Tumoren

Eine verstärkte Expression von Somatostatinrezeptoren konnte in einer Vielzahl von neoplastischen Geweben nachgewiesen werden und dient als eine wichtige Grundlage für die Diagnostik und die Therapie dieser Tumore (Reubi et al. 1992a).

Die Expressionsrate ist abhängig vom Tumor und dem Rezeptorsubtyp. Eine detaillierte Übersicht über die Verteilung der einzelnen SSTR-Subtypen in verschiedenen Tumorentitäten ist in Tabelle 9 dargestellt. Sie basiert auf den Untersuchungen von Hofland und Lamberts (2003). Aus der Tabelle ist zu sehen, dass die meisten Somatostatinrezeptor-positiven Tumore gleichzeitig verschiedene Subtypen exprimieren (Hofland und Lamberts 2003).

Auch die Forschergruppe um Reubi beschäftigte sich mit der Verteilung der Somatostatinrezeptoren in Tumorgeweben. Die Mehrheit der untersuchten Neuroblastome, Meningeome, Medulloblastome, Mammakarzinome, Lymphome, Nierenzellkarzinome, Paragangliome, kleinzelligen Lungenkarzinome und hepatozellulären Karzinome exprimieren überwiegend den SSTR2 (Reubi et al. 2001). Prostatakarzinome und Sarkome weisen vermehrt den SSTR1 auf (Reubi et al. 2001), wohingegen Phäochromozytome sowohl den SSTR1 als auch den SSTR2 und den SSTR3 exprimieren (Hofland und Lamberts 2003, Mundschenk et al. 2003). Die Untersuchung von Koc et al. an hepatozellulären Karzinomen ergab eine hohe Expressionsrate für den SSTR1 (75,6 %) und den SSTR5 (51,2 %) (Koc et al. 2013).

Tabelle 9: Expression verschiedener Somatostatinrezeptoren in humanen Tumoren, nach Hofland und Lamberts (2003)

Die Prozentangaben beziehen sich auf die Prävalenz der jeweiligen Rezeptor-mRNA-Expression in den einzelnen Tumorarten; k. A. = keine Angaben

	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5
Hypophysenadenome					
GH-produzierend	44 %	96 %	44 %	5 %	86 %
ACTH-produzierend	56 %	67 %	25 %	0 %	86 %
hormonell inaktiv	38 %	75 %	43 %	13 %	48 %
Neuroendokrine Tumore					
Karzinoid	76 %	80 %	43 %	68 %	77 %
Gastrinom	79 %	93 %	36 %	61 %	93 %
Insulinom	76 %	81 %	38 %	58 %	57 %
Hormonell inaktive Inselzelladenome	58 %	88 %	42 %	48 %	50 %
Nierenzellkarzinom	85 %	100 %	0 %	50 %	k. A.
Mammakarzinom	33 %	99 %	38 %	23 %	18 %
Meningeom	46 %	100 %	33 %	50 %	71 %
Gliom	100 %	100 %	67 %	71 %	57 %
Neuroblastom	0 %	100 %	17 %	k. A.	k. A.
Kolorektales Karzinom	27 %	87 %	22 %	10 %	46 %
Medulläres Schilddrüsenkarzinom	29 %	79 %	36 %	0 %	64 %
Phäochromozytom	100 %	100 %	73 %	73 %	73 %

2.2.4 Somatostatin-Analoga

Schon kurze Zeit nach der Entdeckung von SST, geriet es aufgrund seiner inhibitorischen Wirkung auf die Zellproliferation und die hormonelle Sekretion in den Mittelpunkt der Tumorforschung (Guillemin 1978). Begrenzt wird die klinische Anwendbarkeit von SST jedoch durch seine kurze Halbwertszeit von nur etwa 1 bis 3 Minuten und der Notwendigkeit der intravenösen Zufuhr. Zusätzlich verursacht SST zahlreiche Nebenwirkungen durch den Einfluss auf andere Organe und einen Rebound-Effekt nach dem Absetzen. Deshalb wurden frühzeitig Analoga mit besseren pharmakologischen Eigenschaften und weniger Nebenwirkungen synthetisiert (Wynick et al. 1989).

Bereits 1980 wurde das Octapeptid Octreotid als Somatostatin-Analogon erfolgreich für die Behandlung der Akromegalie und von neuroendokrinen Tumoren (NET) zugelassen. Durch das Vermindern der GH-Hypersekretion und eine zumindest vorübergehenden Tumorverkleinerung konnte mit Hilfe von Octreotid bei 50 % der Patienten mit NET eine Symptomreduktion bewirkt werden (Offermanns und Rosenthal 2004).

Je nach Expressionsmuster der SSTR-Subtypen sprechen die verschiedenen Tumore unterschiedlich gut auf die Therapie mit Octreotid an. Auch innerhalb einer Entität und im Tumor selbst kann die Verteilung der Rezeptoren variieren (Hofland und Lamberts 2003) (siehe Tabelle 9). Octreotid weist eine hohe Bindungsaffinität zum SSTR2, eine mittlere Affinität zu den SSTR-Subtypen SSTR3 und SSTR5, sowie eine geringe Affinität zum SSTR1 und zum SSTR4 auf (Kulaksiz et al. 2002, Pawlikowski und Meleń-Mucha 2004, Plöckinger und Wiedenmann 2007). Weitere klinisch eingesetzte „klassische“ SST-Analoga wie Lanreotid und Vapreotid zeigen ähnliche Bindungseigenschaften wie Octreotid. Außer bei Hypophysenadenomen und NET des Gastrointestinaltrakts werden die SST-Analoga außerdem bei duodeonalen Blutungen oder dem Dumping-Syndrom eingesetzt (Gräfe et al. 2016).

Das im Jahr 2012 eingeführte SST-Analogen Pasireotid bindet an die Rezeptorsubtypen SSTR1, SSTR2 und SSTR3 und kann aufgrund seiner im Vergleich zu Octreotid erhöhten Bindungsaffinität zum SSTR5 zusätzlich bei Patienten angewendet werden, deren Tumore eine hohe SSTR5-, aber keine oder nur eine geringe SSTR2-Expression aufweisen und die deshalb nicht ausreichend von Octreotid profitieren konnten (Bruns et al. 2002). Pasireotid ist zugelassen für die Behandlung von Patienten mit inoperablem hypophysären Morbus Cushing, da ACTH-produzierende Hypophysenadenome in der Regel nur den SSTR5 und nicht den SSTR2 exprimieren sowie für die Behandlung der Akromegalie und von inoperablen NET des Gastrointestinaltrakts bei fehlendem Ansprechen auf Octreotid (Arnaldi und Boscaro 2010).

Auch in der Diagnostik spielen SST-Analoga eine bedeutende Rolle. Über Chelatoren wie DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure) oder DOTA (1,4,7,10 Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure) können Radionukleotide an SST-Analoga gekoppelt werden. Wird Octreotid an einen Chelator mit einem γ -Strahlen-emittierenden Radionuklid, wie zum Beispiel ^{111}In -Diethylentriamin-Pentaessigsäure (^{111}In -DTPA), gekoppelt, ist eine szintigraphische Darstellung von Tumoren möglich (Reubi et al. 1992b). Van den Anker-Lugtenburg et al. (1996) untersuchten so 56 neu diagnostizierte, unbehandelte HL-Patienten mittels SST-Rezeptorszintigraphie, wobei in 55 Fällen (98 %) eine Positivität der Tumorerläsionen gezeigt werden konnte.

Die Kopplung von Octreotid an Chelatoren mit Positronen emittierenden Radionukliden (z.B. ^{68}Ga), ermöglicht hingegen die Diagnostik von Tumoren mit Hilfe einer PET (Prasad et al. 2007). Die Kombination der PET mit einer Computertomographie (PET/CT) gibt

schließlich genaue Informationen über Lokalisation und Größe des Tumors, was für das weitere therapeutische Vorgehen von entscheidender Bedeutung sein kann (vgl. Kapitel 2.3.5).

SST-Analoga können ebenfalls in der Peptid-vermittelten Radiorezeptor-Therapie (PRRT) genutzt werden. Durch das Markieren des Analogons mit einem Radionuklid ist es möglich, gezielt hohe Dosen ionisierender Strahlung in SSTR-exprimierende Zellen zu schleusen. Aufgrund der selektiven Akkumulation in der Tumorkläsion wird gleichzeitig eine Reduktion der Strahlungstoxizität für die anderen (gesunden) Organe und Gewebe ermöglicht (Zoller et al. 2009). Derzeit sind die β -Strahlen emittierenden Isotope ^{90}Y trium (^{90}Y) und ^{177}Lu lutetium (^{177}Lu) die in der PRRT am häufigsten verwendeten Radionuklide. Beide haben individuelle Vorteile für die Tumorthherapie. ^{90}Y erreicht durch eine höhere Strahlungsenergie (935 keV) eine Gewebedurchdringung von 12 mm. Dadurch eignet es sich vor allem zu Therapie großer Tumore. Die Beta-Partikel von ^{177}Lu hingegen haben eine moderate Energie von 133 keV, wodurch die Gewebepenetration mit 2 mm geringer ist und es deshalb bevorzugt bei kleinen Tumoren eingesetzt wird. Zusätzlich emittiert ^{177}Lu γ -Strahlen, die es der Szintigraphie zugänglich machen und eine Dosimetrie während der PRRT ermöglichen (de Jong et al. 2005). Die bisher am ausführlichsten getesteten SST-Analoga für die PRRT neuroendokriner Tumore sind ^{90}Y -DOTATOC und ^{177}Lu -DOTATATE (de Jong et al. 2005). Sie setzen sich zusammen aus den Radionukliden ^{90}Y bzw. ^{177}Lu , dem Chelator DOTA und dem SST-Analogon Octreotid.

Bisher konnte bei malignen Lymphomen nur eine sehr geringe Aufnahme der Radionuklid-markierten SST-Analoga erreicht werden, weshalb sie derzeit nicht für eine SSTR-basierte PRRT in Frage kommen. Aufgrund der hohen Strahlenempfindlichkeit der Lymphome sollte diese Möglichkeit jedoch weiter evaluiert werden (Dalm et al. 2004). So stellt die Radioimmuntherapie mit ^{90}Y -Ibritumomab-Tiuxetan eine wirksame und gut verträgliche Behandlungsoption für folliculäre NHL mit Rezidiv dar und ist seit 2008 unter dem Namen Zevalin[®] in der EU zugelassen. Der monoklonale Antikörper Ibritumomab bindet das CD20-Antigen der B-Lymphozyten und ermöglicht auf diese Weise eine Bestrahlung der neoplastischen Zellen und des umliegenden Gewebes (Fischer et al. 2009).

2.3 Chemokinrezeptor CXCR4

2.3.1 Chemokine

Chemokine stellen mit etwa 50 verschiedenen Vertretern die größte Untergruppe der Zytokine dar. Die 8–14 kDa großen Signalproteine dienen als Navigationssystem für die Zellen des Immunsystems. Durch die verstärkte Expression von Chemokinen in den Zielgeweben entsteht ein chemischer Gradient, dem die Immunzellen in einer gerichteten Bewegung zur höchsten Konzentration hin folgen. Dieser Vorgang wird als Chemotaxis bezeichnet (Howard et al. 1996, Rink et al. 2012).

Nach Chensue und Kollegen (2001) sind fast alle Organe des menschlichen Körpers in der Lage, Chemokine zu bilden. Einige Chemokine scheinen jedoch nur in bestimmten Organen exprimiert zu werden. Das deutet darauf hin, dass sie eine bestimmte organspezifische Aufgabe erfüllen.

Nach ihrer Funktion werden die Chemokine in inflammatorische und homöostatische Chemokine eingeteilt. Inflammatorische Chemokine werden im Rahmen von Entzündungsprozessen gebildet, um die Zellen des Immunsystems an den Ort der Schädigung oder der Infektion zu locken. Der Gradient besteht dort dann nur für einen bestimmten Zeitraum. Die homöostatischen Chemokine werden kontinuierlich von Geweben gebildet und binden an Endothelzellen oder Zellmembranen, um nicht zu schnell verdünnt oder ausgespült zu werden. Sie ermöglichen so die Migration der Immunzellen (insbesondere Lymphozyten und Dendritische Zellen) in ihre Zielgewebe, beispielsweise das Knochenmark oder die Lymphknoten. Dafür benötigen die Immunzellen auf ihrer Oberfläche bestimmte Chemokinrezeptoren, mit denen sie an die Chemokine binden können (Rink et al. 2012, Yoshie 2013).

Neben der funktionellen existiert auch eine Einteilung der Chemokine nach strukturellen Gesichtspunkten. An ihrem N-Terminus besitzen alle Chemokine Cysteinreste, die über eine oder zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Entsprechend der Anzahl und Position der Cysteinreste ergibt sich eine systematische Nomenklatur, die die Chemokine in vier Untergruppen einteilt: C, CC, CXC, CXXXC (oder CX₃C). Das C steht für den Cysteinrest, das X für einen jeweiligen beliebigen anderen Aminosäurerest. CXC-Chemokine sind also charakterisiert durch eine Aminosäure (X) zwischen den beiden N-terminalen Cysteinresten (C), bei CX₃C hingegen werden sie von 3 Aminosäuren getrennt (Le et al. 2004).

Der Name der Chemokine setzt sich aus der Bezeichnung der jeweiligen Untergruppe, einem „L“ für Ligand und einer Nummer zusammen (Rink et al. 2012). Daneben besitzen manche Chemokine weitere Bezeichnungen. So wird das Chemokin CXCL12 auch SDF-1 (*stromal cell-derived factor-1*) genannt. Es bindet an die Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 und spielt eine besondere Rolle bei der Chemotaxis von T-Zellen, Monozyten und von lymphatischen sowie hämatopoetischen Vorläuferzellen. Gebildet wird CXCL12 vor allem in Lunge, Leber, Skelettmuskel, Gehirn, Niere, Herz, Haut und Knochenmark (Teicher und Fricker 2010). Die Forscher um Nagasawa (1996) entdeckten, dass Mäuse ohne CXCL12-Expression nicht lebensfähig sind, da sie schwerste Defekte in der Hämatopoese und im kardiovaskulären System aufwiesen. Zudem wurde gezeigt, dass die Interaktion von CXCL12 und CXCR4 eine tragende Rolle bei verschiedenen entzündlichen Prozessen im menschlichen Körper spielt. Beispielsweise steigt der CXCL12-Spiegel bei entzündlichen Lebererkrankungen im Vergleich zur gesunden Leber deutlich an. Auch in Lymphomen, Gliomen, Pankreas- und Ovarialkarzinomen wurde eine Expression des Chemokins CXCL12 entdeckt. Hier fördert es das Wachstum und das Überleben von CXCR4-positiven Tumorzellen (Balkwill 2004a).

2.3.2 Aufbau und Funktion des CXCR4

Der auch als CD184, Leukocyte-derived seven transmembrane domain receptor (LESTR) oder Fusin bekannte CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) gehört zur Gruppe der Chemokinrezeptoren. Wie bei den SSTR handelt es sich auch beim CXCR4 um einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Die Chemokinrezeptoren bilden die größte Untergruppe der Gamma-Subfamilie von Rhodopsin-ähnlichen Sieben-Transmembranrezeptoren. Sie kommen in unterschiedlicher Dichte auf allen Leukozyten und vielen nicht-hämatopoetischen Zellen vor (Ratajczak et al. 2006).

Der CXCR4 sticht in mehreren Punkten aus der Gruppe der Chemokinrezeptoren hervor. Nur er stellte sich bei Experimenten mit Knockout-Mäusen als essenziell für das Überleben heraus (Murphy et al. 2000). War der Rezeptor aufgrund von Gendefekten nicht vorhanden oder funktionsfähig, kam es bereits während der Embryonalzeit zu einem Absterben der Mäuse aufgrund einer gestörten Organvaskularisation (Tachibana et al. 1998). Zusätzlich besitzt der CXCR4 im Vergleich zu den anderen Rezeptoren seiner Gruppe ein sehr breites Spektrum an Funktionen und nachgeschalteten Signalkaskaden. Darunter zählen die Zellmigration (Homing), die Neovaskularisation von Geweben, das Überleben und das Wachstum von Zellen (Petit et al. 2007). Außerdem fungiert der CXCR4 als HIV-1-Co-Rezeptor und war

deshalb Target zahlreicher Forschungsansätze zur Behandlung der HI-Virus-Infektion (Feng et al. 1996).

Der einzige bisher bekannte endogene Ligand für den CXCR4 ist das Chemokin CXCL12. Dieses sorgt dafür, dass sich die CXCR4-positiven Zellen in Richtung der höheren CXCL12-Konzentration bewegen. Die gesteigerte Motilität der Zellen entsteht durch eine gesteigerte Aktinpolymerisation, welche wiederum durch die Bindung von CXCL12 an CXCR4 ausgelöst wird (Müller et al. 2001, Furusato et al. 2010). Meist sind am CXCR4 inhibierende G-Proteine gebunden, welche eine $G\alpha_i$ -Einheit besitzen. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass auch $G\alpha_q$ - oder $G\alpha_s$ -Untereinheiten gebunden werden können (Teicher und Fricker 2010).

2.3.3 Bedeutung bei der Entstehung bösartiger Neubildungen

Die CXCL12/CXCR4-Achse ist bei verschiedenen Aspekten der Tumorprogression, einschließlich Angiogenese, Metastasierung und Überleben der Zellen beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen aus mindestens 23 verschiedenen Arten von menschlichen Karzinomen epithelialen, mesenchymalen oder hämatopoetischen Ursprungs den CXCR4 exprimieren (Balkwill 2004b).

Tumorzellen mit positivem CXCR4-Status wandern aufgrund der chemotaktischen Wirkung in Organe mit erhöhter CXCL12-Expression, wie beispielsweise Knochenmark, Lunge und Leber, wodurch dort vermehrt Metastasen entstehen (Jacobson und Weiss 2013). So gilt eine hohe CXCR4-Expressionsrate maligner Lymphozyten bei der akuten lymphatischen Leukämie (ALL) als starker Prädiktor für extramedulläre Manifestationen der Erkrankung (Spiegel et al. 2004). Auch Mammakarzinome, die den CXCR4 exprimieren, wachsen und metastasieren wesentlich schneller als CXCR4-negative Tumore (Müller et al. 2001). Die Forschergruppe um Il-Kang Na (2008) fand zudem heraus, dass bei Brustkrebs, Kolon- und Rektumkarzinomen, Osteosarkomen und hepatozellulären Karzinomen ein direkter Zusammenhang zwischen einer erhöhten CXCR4-Expression und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen besteht.

Weiterhin fördert die Chemokin-Chemokinrezeptor-Interaktion das Tumorwachstum und bewirkt eine gesteigerte Tumorangiogenese. Eine hohe Konzentration an CXCL12 im Tumorgewebe sorgt dafür, dass CXCR4-positive Zellen wie hämatopoetische Stammzellen und Stammzellen von Endothelzellen chemotaktisch in den Tumor wandern und so die Angiogenese begünstigen (Teicher und Fricker 2010). Müller (2001) beschreibt am Beispiel

des Brustkrebses, dass es durch die Aktivierung von CXCR4 bei den Krebszellen zur gesteigerten Actinpolymerisation und Ausbildung von Pseudopodien kommt. Diese Zellvorgänge dienen der Bewegung der Krebszellen und sind Voraussetzung für ein invasives Wachstum. So ist der CXCR4 zum Beispiel an der Invasion und Angiogenese des Pankreaskarzinoms beteiligt (Matsuo et al. 2009). Studien belegen außerdem eine Korrelation zwischen einer hohen Expression von CXCR4 und einer schlechteren Prognose der Patienten sowie einer Resistenz gegen eine Chemotherapie. Chen et al. (2015) untersuchten die CXCR4-Expression bei 743 Patienten mit de-novo-DLBCL, die eine Chemotherapie nach dem R-CHOP-Schema bekommen hatten. Es stellte sich heraus, dass Patienten mit CXCR4-positiven Tumor und einem IPI ≤ 2 (siehe Tabelle 7) eine kürzere Gesamtüberlebenszeit aufwiesen. Bei Patienten mit einem IPI von drei oder vier, hatte die CXCR4-Positivität des Tumors jedoch keine prognostische Relevanz. Außerdem war eine CXCR4-Expression häufiger vertreten bei männlichen Patienten, bei Patienten mit einer großen Tumormasse oder in Verbindung mit einer extranodalen Beteiligung. Weiterhin war eine verminderte CXCR4-mRNA-Expression im Knochenmark nach Chemotherapie-Behandlung bei NHL-Patienten mit einer besseren Prognose verbunden (Mazur et al. 2014).

Die genauen Mechanismen, die die CXCR4-Expression von Tumoren beeinflussen, sind noch nicht vollständig verstanden. Es sind mehrere Faktoren bekannt, die die Expression des CXCR4 steigern können. Hierbei spielt insbesondere der sogenannte Hypoxie-induzierte Faktor 1α (HIF- 1α) eine wichtige Rolle, da er sowohl einen Anstieg der CXCR4-Expression bewirkt, als auch die Migration von CXCR4-positiven Zellen zu Geweben mit vermehrter CXCL12-Produktion triggern kann (Liu et al. 2006). So kann es durch Mutationen zu einer Beeinflussung des HIF- 1α -Gehaltes in den Tumorzellen kommen und somit auch zu einer veränderten CXCR4-Expression (Balkwill 2004a). Auch der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) führt zu einer Steigerung der CXCR4-Expression in den Tumoren. Durch VEGF wird die Angiogenese und Vaskulogenese durch Stimulation der vaskulären Endothelzellen erhöht (Yla-Herttuala et al. 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es bei Brustkrebs durch eine gesteigerte Bildung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu einem direkten Anstieg der CXCR4-Expression kommt (Helbig et al. 2003).

2.3.4 CXCR4-Antagonisten

Die ersten CXCR4-Antagonisten wurden in den 1990er Jahren für die Therapie der HI-Virus-Infektion entwickelt. Dazu gehört das nicht-peptidische AMD3100, welches heute unter dem Namen Plerixafor in Kombination mit dem Peptidhormon G-CSF eingesetzt wird. In klinischen Studien wurde durch das Medikament eine Mobilisierung von hämatopoetischer Stammzellen beobachtet, die bei den Probanden zu einem schnellen Anstieg der Leukozyten im Blut führte. Durch den selektiven Antagonismus am CXCR4 beeinflusst Plerixafor direkt die Chemokin-Chemokinrezeptor-Bindung, über die die Stammzellen im Knochenmark verankert sind. Die mobilisierten Stammzellen werden bei der peripheren Stammzellspende und bei der autologen Stammzelltransplantation angewendet. Das seit 2009 zugelassene Medikament stellt eine Therapieoption für Patienten mit NHL und Multiplen Myelom dar, die für eine autologe Stammzelltransplantation mit alleiniger G-CSF-Behandlung nicht ausreichend Stammzellen mobilisieren konnten (Kim et al. 2016). Auch für Patienten mit rezidivierendem oder refraktärem HL konnte in Studien ein Vorteil für den zusätzlichen Einsatz von Plerixafor zu G-CSF nachgewiesen werden (Cashen et al. 2008). Weiterhin wird eine synergistische Wechselwirkung zwischen Plerixafor und Rituximab beschrieben. Bei Mäusen mit disseminiertem Burkitt-Lymphom und DLBCL führte die Kombination beider Medikamente zu einer signifikanten Zunahme des Überlebens im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Rituximab (Hu et al. 2012, Reinholdt et al. 2016). Zusätzlich zur Steigerung der Wirkung von Rituximab konnte nachgewiesen werden, dass eine CXCR4-Antagonisierung auch die Wirkung anderer Komponenten des R-CHOP-Schemas verstärkt. Für die ALL konnte gezeigt werden, dass Plerixafor die Vincristin-Wirksamkeit *in vitro* und *in vivo* erhöht. Auch das Überleben von ALL-Mäusen konnte verlängert werden, wenn Plerixafor zusätzlich zu Vincristin gegeben wurde (Juarez et al. 2003, Welschinger et al. 2013). In einer *in-vitro*-Studie von Azab et al. (2009) konnte weiterhin gezeigt werden, dass Multiple Myelom-Zellen empfindlicher gegenüber Doxorubicin sind, wenn die Tumorzellinteraktion mit den Knochenmarkstromazellen durch Plerixafor unterbrochen wurde.

2.3.5 CXCR4-Nachweis mittels ⁶⁸Ga-Pentixafor-PET/CT

Der Chemokinrezeptor CXCR4 bietet ein attraktives Ziel für die Tumordiagnose, da er am Tumorwachstum, der Zellmigration und der Bildung von Metastasen beteiligt ist (vgl. Kapitel 2.3.3). Durch die Entwicklung spezifischer Liganden können radioaktiv markierte Sonden

hergestellt werden, die mit Hilfe von Positronenemissionstomographie und Computertomographie (PET/CT) die Tumormasse anatomisch lokalisieren und quantifizieren lassen. Die einzige Verbindung, die bisher in die klinische Anwendung gelangt ist, ist das cyclische Pentapeptid ^{68}Ga -Pentixafor (Demmer et al. 2011). Durch die Verknüpfung mit dem Radionuklid Gallium (^{68}Ga), kann Pentixafor mittels einer PET detektiert werden und CXCR4-positive Tumore sichtbar machen (Wester et al. 2014). Das instabile Gallium hat eine Halbwertszeit von 68 Minuten und sendet bei seinem Zerfall Positronen aus, die von einem Scanner detektiert werden können. Die Kombination der PET mit einer CT gibt schließlich genaue Informationen über Lokalisation und Größe des Tumors, was für das weitere therapeutische Vorgehen von entscheidender Bedeutung sein kann. In der Untersuchung von Wester et al. (2014) wurden verschiedene Tumore (Lymphome, Leukämie, Myelom, Kehlkopfkarzinom, Pankreaskarzinom, Melanom, Prostatakarzinom) untersucht. Besonders bei der chronischen lymphatischen Leukämie und bei den Lymphomläsionen kam es bei der PET/CT-Untersuchung mit dem ^{68}Ga -Pentixafor zu einer intensiven Traceraufnahme in das Tumorgewebe mit sehr guter Bildqualität und geringer Aufnahme in Zielgeweben ohne CXCR4-Expression.

2.3.6 Peptid-vermittelte Radiorezeptor-Therapie mit $^{177}\text{Lu}/^{90}\text{Y}$ - Pentixather

Basierend auf dem Erfolg von ^{68}Ga -Pentixafor als bildgebende Sonde für die CXCR4-Expression, wurde auch gezielt in Richtung einer therapeutischen Wirksamkeit im Sinne einer PRRT geforscht. Pentixafor wurde durch die Arbeitsgruppe um Schottelius et al. (2017) strukturell mittels einer Iodierung des Tyrosins im Peptidgerüst modifiziert (siehe Abbildung 4). Das so entstandene Pentixather wurde dann mit den β -strahlenden Radioisotopen Lutetium (^{177}Lu) und Yttrium (^{90}Y) markiert. Das $^{177}\text{Lu}/^{90}\text{Y}$ -Pentixather zeigte eine hohe Affinität, Selektivität und Spezifität für den CXCR4, mit guten pharmakokinetischen Eigenschaften und einer günstigen Gesamtdosimetrie (Schottelius et al. 2017).

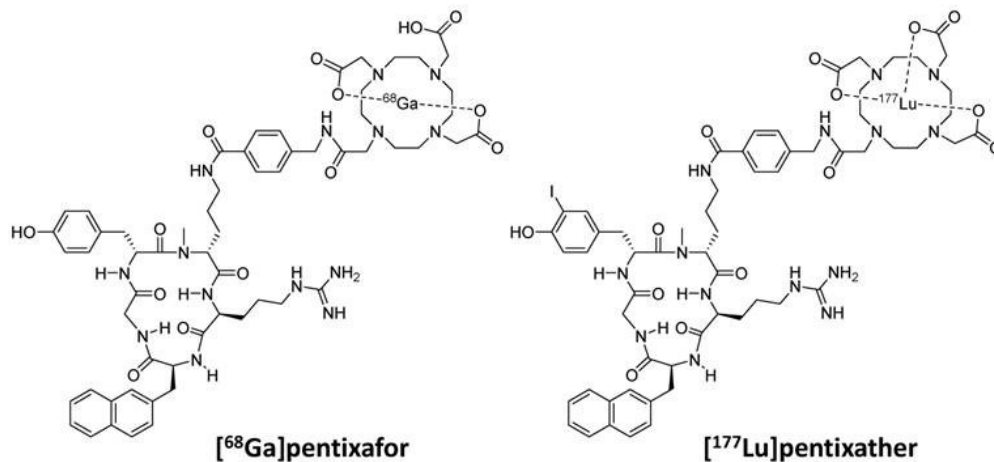


Abbildung 4: Chemische Struktur von ⁶⁸Ga-Pentixafor und ¹⁷⁷Lu-Pentixather (modifiziert nach Schottelius et al. 2017)

Die ersten klinischen Erfahrungen wurden durch Hermann et al. (2016) ermöglicht. Sie untersuchten die Wirkung von ¹⁷⁷Lu/⁹⁰Y- Pentixather an drei Patienten mit fortgeschrittenem Multiplen Myelom und extramedullärer Beteiligung. Bei zwei der Patienten konnte dabei in Verbindung mit einer Chemotherapie und einer autologen Stammzelltransplantation ein signifikanter therapeutischer Effekt erreicht werden. Gemessen wurde dies an einem reduzierten Glukosestoffwechsel mit verminderter Aufnahme von ¹⁸F-FDG (Fluor-18-Fluorodesoxyglucose) in der PET/CT. Diese Studie bestätigt die allgemeine Durchführbarkeit und das hohe Potenzial eines auf ⁶⁸Ga-Pentixafor/¹⁷⁷Lu-Pentixather basierenden theranostischen Konzepts. Derzeit sind jedoch noch weiterführende Untersuchungen im präklinischen und klinischen Bereich erforderlich, um die mögliche Rolle der endoradiotherapeutischen Behandlung von CXCR4-exprimierenden Malignomen zu bewerten (Schottelius et al. 2017).

2.4 Ki-67-Proliferationsindex

Das Protein Ki-67 wurde ursprünglich durch den monoklonalen Antikörper Ki-67 definiert, der durch Immunisierung von Mäusen mit Kernen der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L428 erzeugt wurde. Der Name stammt von der Herkunftsstadt (Kiel) und der Nummer des Originalklons in der 96-Well Mikrotiterplatte (Gerdes et al. 1983).

Die genaue Funktion des Proteins Ki-67 ist bis heute nicht vollends geklärt. Bekannt ist allerdings, dass seine Expression in direkter Verbindung mit der Proliferationsaktivität eines Gewebes steht. In allen aktiven Zellzyklus-Phasen (G_1 -, S-, G_2 -Phase und Mitose) kann das Protein Ki-67 im Nukleus detektiert werden. Einzig bei inaktiven Zellen in der G_0 -Phase ist das Protein nicht zu beobachten. Aus diesem Grund ist es möglich, durch das Nachweisen von Ki-67 eine Aussage über den Grad der Proliferation eines Tumorgewebes zu machen (Scholzen und Gerdes 2000).

3 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Untersuchung von Präparaten maligner Lymphome auf das Vorhandensein der Rezeptoren SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4, SSTR5 und CXCR4.

Die bereitgestellten Tumore gehörten zu verschiedenen Entitäten der Hodgkin-Lymphome und der Non-Hodgkin-Lymphome (B-Zell-Leukämie, Marginalzonenlymphom, Mantelzelllymphom, nicht weiter spezifizierte T- und B-Zell-Lymphome). Von den Tumorproben wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt und mit Hilfe des Immunreaktiven Scores ausgewertet. Durch eine manuelle Auszählung wurden außerdem die Ki-67-positiven Zellkerne der Präparate und der Proliferationsindex ermittelt.

Mit den Ergebnissen wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Tumorentitäten und Rezeptorhäufigkeiten untersucht und analysiert, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression der verschiedenen Rezeptoren und dem Proliferationsindex sowie mit klinischen Daten besteht. Weiterhin wurde auf mögliche Rezeptorkombinationen geachtet, um bei bekanntem Rezeptorbesatz eventuell auf das gleichzeitige Vorhandensein eines weiteren Rezeptors zu schließen.

Die Kenntnis über bestimmte Rezeptorexpressionen bei verschiedenen Tumorentitäten könnte eine individualisierte Behandlung dieser Erkrankungen ermöglichen. Es wäre nicht auszuschließen, dass Tumore mit einer starken SSTR2-Expression von einer Therapie mit Octreotid profitieren. Weiterhin ist der therapeutische Einsatz von Pasireotid für SSTR1-, SSTR3- oder SSTR5-positive Tumore und von Plerixafor für CXCR4-positive Tumore denkbar. Des Weiteren ist das Wissen über die Expression von SST-Rezeptoren bedeutend für die Differenzierung anderer Neoplasien. So können falsch-positive Befunde in der PET/CT mit radioaktiv-markiertem-Plerixafor bei z.B. Neuroendokrinen Tumoren durch die Expression von Somatostatinrezeptoren anderer Malignome entstehen.

Diese Arbeit soll eine Grundlage für weitere Untersuchungen der verschiedenen Somatostatinrezeptoren und des Rezeptors CXCR4 an anderen Tumoren des Menschen schaffen. Da die Beeinflussung dieser Rezeptoren in Zukunft möglicherweise einen neuen bedeutenden Ansatz in der Therapie maligner Erkrankungen darstellen kann.

4 Material und Methoden

4.1 Tumorproben

4.1.1 Tumormaterial

Für die immunhistochemische Färbung wurden insgesamt 108 Tumorpräparate aus dem Labor für Zytologie und Pathologie in Bad Berka (93 der Präparate) und dem Institut für Hämatopathologie in Kiel (15 der Tumorpräparate) zur Verfügung gestellt.

Die Gewebeproben stammten von 47 unterschiedlichen Patienten verschiedener Hodgkin-Lymphome (2 der Patienten) und Non-Hodgkin-Lymphome (42 der Patienten). Von 20 der Patienten lag mehr als ein Tumorblock vor. Die Proben waren zum Teil aus demselben Tumor oder stammten von unterschiedlichen befallenen Gewebe eines Patienten.

Votum der Ethikkommission

Für dieses Forschungsvorhaben und die damit verbundene Verwendung von Patientendaten liegt ein befürwortendes Votum der Ethikkommission der Landesärztekammer Thüringen vor.

4.1.2 Gerätschaften und Materialien für die Herstellung der Gewebeschnitte

Gerätschaften zur Herstellung der Gewebsschnitte

Rotationsmikrotom HM 335 E	Microm, Walldorf, Deutschland
Streckbad	Medax Nagel GmbH, Kiel, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland

Materialien zur Herstellung der Gewebeschnitte

Objektträger SuperFrost®plus	Thermo Fischer Scientific, Bonn, Deutschland
------------------------------	--

4.1.3 Herstellung der Gewebeschnitte

Aus den Tumorblöcken wurde mittels Mikrotom Schnitte mit einer Dicke von 4 µm angefertigt und auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht. Nach vollständiger Trocknung bei Raumtemperatur konnten die immunhistochemischen Färbungen durchgeführt werden.

4.2 Immunhistochemie

Von jedem Block wurden Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, sowie auf sechs verschiedene Antigene (SSTR1, SSTR2A, SSTR3, SSTR4, SSTR5 und CXCR4) immunhistochemisch untersucht.

4.2.1 Materialien und Gerätschaften für die Immunhistochemie

Chemikalien für die Immunhistochemie

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	BioGenex Laboratories, Fremont, CA, USA
Ammoniak-Lösung 25 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DePeX	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol 99,8 %	Echter Nordhäuser Spirituosen GmbH, Nordhausen, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mayer`s Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat-Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Rinderserumalbumin (RSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Salzsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triethylendiamin (DABCO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trometamol (TRIS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Gerätschaften für die Immunhistochemie

Analysenwaage A200S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
---------------------	--------------------------------------

Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Färbekästen (Glas)	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Glas-Färbegestelle	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Magnetrührer	Schott Instruments, Mainz, Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrowelle CB1271	Bomann, Kempen, Deutschland
pH-Meter pH 211	Hanna Instruments, Kehl, Deutschland
Shandon Coverplates®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Shandon Sequenza®-Färbesystem	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Lösungen und Standardpuffer für die Immunhistochemie

PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung, pH 7,4)

8,18 g	NaCl
1,77 g	Na ₂ HPO ₄
0,2 g	KCl
0,24 g	KH ₂ PO ₄
auf 1000 ml	Aqua bidest.

PBS/1 % RSA (Rinderserumalbumin)

495 ml	PBS
5 g	Rinderserumalbumin

Citratpuffer-Stammlösung A (0,1 M)

21,01 g	Zitronensäure
auf 1000 ml	Aqua bidest.

Citratpuffer-Stammlösung B (0,1 M)

29,41 g	Natriumcitrat
auf 1000 ml	Aqua bidest.

Citratpuffer (0,01 M, pH 6,0)

36 ml	Stammlösung A
164 ml	Stammlösung B
1800 ml	Aqua bidest.

Ammoniakwasser

250 ml Aqua bidest.
1,4 ml Ammoniak 25 %

0,15 % Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung

600 ml Methanol
3 ml Wasserstoffperoxid 30 %

Färbelösung, 10 ml (3-Amino-9-Ethylcarbazol)

8 ml Aqua bidest.
2 ml Acetat-Puffer, 5-fach konzentriert
4 Tropfen Aminoethylcarbazol

Blockierungslösung

10 ml PBS/1 % RSA
150 µl Ziegenserum

Sekundär-Antikörper

10 ml PBS/1 % RSA
150 µl Ziegenserum
50 µl biotinylierter Sekundärantikörper (Anti-Kaninchen IgG)

Avidin-Biotin-Enzym-Komplex

5 ml PBS/1 % RSA
100 µl Reagenz A (Avidin)
100 µl Reagenz B (biotinylierte Peroxidase)

Mowiol-Eindecklösung

6 g Glycerin
2,4 g Mowiol 4-88
6 ml Aqua bidest.
12 ml Tris-HCl (pH 8,5)
25 mg/ml Lösung DABCO (1,4-Diaza-bicyclo(2,2,2)octan)

Kits für die Immunhistochemie

AEC Substrate Pack	BioGenex, Fremont, CA, USA
VECTASTAIN® Elite ABC-Kit (Rabbit IgG)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Antikörper für die Immunhistochemie

UMB-7 (Anti-SSTR1)	Epitomics, Burlingame, CA, USA
UMB-1 (Anti-SSTR2)	Epitomics, Burlingame, CA, USA
UMB-5 (Anti-SSTR3)	Epitomics, Burlingame, CA, USA
UMB-4 (Anti-SSTR5)	Epitomics, Burlingame, CA, USA
4802 (Anti-SSTR4)	Gramsch Laboratories, Schwabhausen, Deutschland
UMB-2 (Anti-CXCR4)	Epitomics, Burlingame, CA, USA

Tabelle 10: Verwendete Primärantikörper

Humaner Rezeptor (Aminosäurenummer)	Antikörper	Klonnummer	Antigene Sequenz des Peptids
SSTR1(377-391)	UMB-7	11/12	ENLESGGVFRNGTCTSRITTL
SSTR2 (355-369)	UMB-1	97/1	ETQRTLLNGDLQTSI
SSTR3 (398-418)	UMB-5	31/10	QLLPQEASTGEKSSTMRISYL
SSTR4 (366-388)	4802		CQQEALQPEPGRKRIPLTRTTTF
SSTR5 (344-364)	UMB-4	30/5	QEATPPAHRAAANGLMQTSKL
CXCR4 (338-359)	UMB-2	232/8	KRKRGGHSSVSTESSESSSFHSS

Die Antikörper UMB-1, UMB-2, UMB-4, UMB-5 und UMB-7 sind monoklonale Kaninchen-Antikörper, die an ihren Rezeptor an das carboxyterminale Ende binden. Einzig der Anti-SSTR4-Antikörper 4802 ist polyklonal. Der verwendete Sekundärantikörper ist ein Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper, der kovalent an Biotin gekoppelt ist und artspezifisch an den Primärantikörper bindet. Die Verdünnungen der Primärantikörper aus den Zellkulturen der entsprechenden Antikörper-produzierenden Zellklone erfolgten entsprechend den Angaben der Tabelle 11.

Tabelle 11: Antikörper-Verdünnung

Rezeptor	Antikörper	Verdünnung
SSTR1	UMB-7	1:10
SSTR2	UMB-1	1:10
SSTR3	UMB-5	1:20
SSTR4	4802	0,5 µg/ml
SSTR5	UMB-4	1:10
CXCR4	UMB-2	1+1

4.2.2 Prinzip der Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie können Antigene in einem Gewebe sichtbar gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die indirekte Peroxidase-Methode zum Detektieren der CXCR4- und Somatostatin-Rezeptoren verwendet. Hierfür wird ein Primärantikörper benutzt, der spezifisch an ein Epitop der Rezeptoren bindet. Sein Fc-Teil stellt außerdem die Bindungsstelle für einen zweiten Antikörper dar. Dieser sogenannte Sekundärantikörper ist kovalent mit Biotin gekoppelt, woran im nächsten Schritt ein Avidin-Peroxidase-Komplex bindet (siehe Abbildung 5). Avidin stellt demnach eine Art Brücke zwischen Biotin und der Peroxidase dar (Hsu et al. 1981). Wird letztendlich das Chromogen AEC hinzugegeben, kommt es durch die Umsetzung des Farbstoffes durch die Peroxidase zu einer charakteristischen und lokalisierten Rotbraunfärbung im Zielgewebe, die den Nachweis des Antigens darstellt (Böcker et al. 2012).

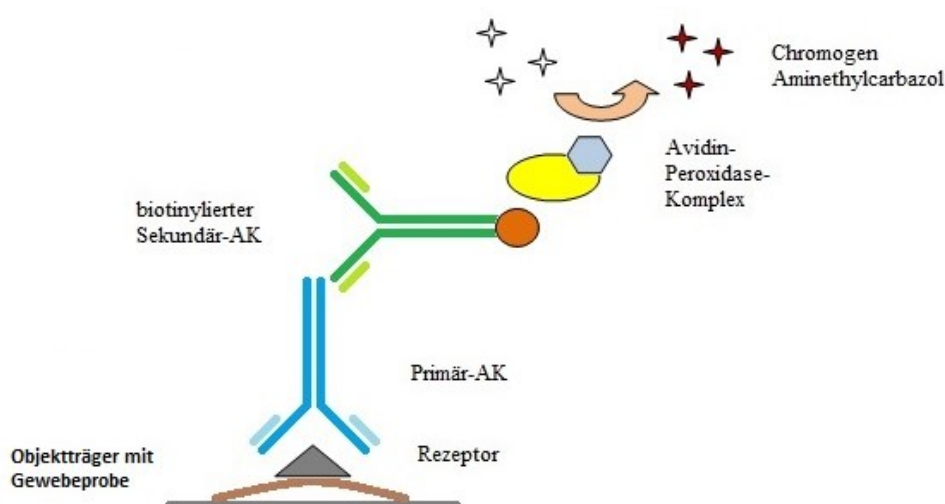


Abbildung 5: Darstellung der indirekten Peroxidase-Methode
AK = Antikörper

4.2.3 Durchführung der Immunhistochemie

Die detaillierte Durchführung der immunhistochemischen Färbung, welche für die Präparate in dieser Arbeit verwendet wurde, kann aus dem Protokoll in Tabelle 12 entnommen werden.

Tabelle 12: Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Arbeitsschritte	Lösungen	Mengen [µl]	Inkubationszeit [min]
1. Für die nachfolgenden Schritte werden alle Präparate in Glas-Färbeküvetten einsortiert.			
2. Entparaffinieren	Xylol		20
	Xylol		20
	Xylol		20
3. Xylol entfernen	99,8 % Ethanol		20
	99,8 % Ethanol		20
	99,8 % Ethanol		20
4. Blockieren der endogenen Peroxidase, zum Verhindern unspezifischer Färbungen	3 % H ₂ O ₂ in Methanol		45
5. Rehydrierung der Schritte durch absteigende Alkoholreihe	95 % Ethanol		2
	95 % Ethanol		2
	80 % Ethanol		2
	70 % Ethanol		2
	Aqua bidest.		5
	Aqua bidest.		5
6. Für den nachfolgenden Schritt werden alle Objektträger aus den Glas-Färbeküvetten in Citrat-Puffer-gefüllte Plastikkuvetten umsortiert.			
7. Demaskierung der Antigene zur Verstärkung der Signalintensität	In Citrat-Puffer (0,01 M, pH 6,0) in der Mikrowelle bei 600 W		8 min Kochen 4 min Abkühlen 4 min Kochen 4 min Abkühlen 4 min Kochen
8. Im Anschluss müssen die Präparate für etwa 30 Minuten abkühlen und werden dann in den Körben der Plastikkuvetten für mindestens 5 Minuten in Aqua bidest. gestellt.			
9. pH-Pufferung, Absättigung der unterschiedlichen Ladungen innerhalb des Gewebes, zum Vermeiden unspezifischer Bindungen	PBS mit 1 % RSA		5
10. Anschließend werden die Objektträger in Sequenza®-Färbesysteme einsortiert. Darin entsteht ein kapillärer Spalt, in den die weiteren Lösungen zugegeben werden.			

11. pH-Pufferung, Absättigung der unterschiedlichen Ladungen innerhalb des Gewebes	PBS mit 1 % RSA	1500	
12. Blockierung unspezifischer Bindungen, zum Vermeiden von Hintergrundfärbungen	Normales Ziegen-Serum (entsprechend der Spezies des Sekundär-AKs)	150	20
13. Bindung des primären AK	AK UMB-1/2/4/5/7 bzw. 4801	300	Bei 4 °C über Nacht (im Kühlraum)
14. Waschen der Schnitte, um nicht oder unspezifisch gebundene AK zu entfernen	PBS mit 1 % RSA	1500	
	PBS mit 1 % RSA	1500	
15. Zugabe des Sekundär-AK	Biotinylierter Ziegen-Anti-Kaninchen-AK	150	30
16. Waschen der Schnitte, um nicht oder unspezifisch gebundene AK zu entfernen	PBS mit 1 % RSA	1500	
17. Zugabe des enzymgekoppelten Komplexes, um die Farbreaktion zu ermöglichen	Avidin-Peroxidase-Komplex	150	30
18. Waschen der Schnitte, zum Entfernen nicht oder unspezifisch gebundener Komplexe	PBS mit 1 % RSA	1500	
19. Färben der AK-gebundenen Bereiche durch Zugabe des Substratchromogens	AEC	150	15
	AEC	150	15
20. Waschen und damit Stoppen der Reaktion	Aqua bidest.	1500	
21. Für die weitere Bearbeitung werden die Präparate aus den Färbesystemen in die Glas-Färbeküvetten zurücksortiert.			
22. Waschen	Aqua bidest.	1500	1
	Aqua bidest.	1500	1
23. Gegenfärbung der Zellkerne	Mayer's Hämatoxylin		3 sek
24. Waschen	Aqua bidest.		2,5
25. Hämatoxylin-Bläuung	Ammoniakwasser		5 x eintauchen
26. Waschen	Aqua bidest.		2,5
27. Im Anschluss daran werden die Präparate mit Mowiol und Deckgläschen eingedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet.			

4.2.4 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

4.2.4.1 Lichtmikroskopische Auswertung

Ein Zeiss-Mikroskop mit verschiedenen Vergrößerungen stellte die Grundlage für die Auswertung der gefärbten Präparate dar. Schwerpunktmäßig standen Farbintensität, Färbeanteil, Art und Weise der Färbung, Membranständigkeit, Vaskularisierung, Verteilungs- und Expressionsmuster gefärbter Areale sowie im umliegenden Gewebe gefärbte Gebiete im Fokus.

4.2.4.2 Immunreaktiver Scores

Für die semiquantitative Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Tumorpräparate wurde der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner (1987) verwendet.

Mit Hilfe des Lichtmikroskops wurde zuerst der Prozentsatz positiv gefärbter Zellen bestimmt. Abhängig davon, wie hoch der Anteil gefärbter Tumorzellen war, wurden zwischen 0 und 4 Punkten vergeben. Anschließend wurde die Färbeintensivität dieser Zellen mit 0 – 3 Punkten beurteilt. Eine positive Färbung konnte als schwach (1 Punkt), mäßig (2 Punkte) oder stark (3 Punkte) eingeschätzt werden. Durch Multiplizieren der Werte aus dem Prozentsatz positiver Zellen und der Färbeintensität ergibt sich der IRS mit einer Punktzahl zwischen 0 und 12 (siehe Tabelle 13).

War das Tumorgewebe ungleichmäßig angefärbt, gab es also Teile mit schwacher und starker Färbung in einem Präparat, wurde die Intensität entsprechend deren Verteilung ermittelt. Waren zum Beispiel 30 % der Tumorzellen schwach, 10 % mäßig und 60 % stark gefärbt, besteht das gesamte Gewebe aus positiven Zellen (4 Punkte für den Prozentsatz). Der zweite Faktor ergibt sich nun gemäß der Verteilung der einzelnen Färbeintensitäten.

Rechenbeispiel

4 Punkte (100 % gefärbte Zellen) x (1 x 30 % (schwach gefärbte Zellen) + 2 x 10 % (mäßig gefärbte Zellen) + 3 x 60 % (stark gefärbte Zellen)) = 4 x (0,3 + 0,2 + 1,8) = 4 x 2,3 = 9,2

Wurde von einem Patienten mehr als eine Schnittprobe bewertet, wurde das arithmetische Mittel aus dem IRS der einzelnen Schnitte berechnet.

Als Abgrenzung von rezeptornegativen zu rezeptorpositiven Tumoren gilt ein IRS-Wert größer 2. Proben mit 0 bis 2 Punkten sind rezeptornegativ, Proben mit 3 oder mehr Punkten rezeptorpositiv. Weiterhin wird je nach IRS-Wert zwischen schwacher, mäßiger und starker Positivität unterschieden (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner (1987)

Prozentsatz positiver Zellen	x Färbeintensität	= IRS
0 Punkte (<i>keine positiven Zellen</i>)	0 Punkte (<i>keine Färbung</i>)	0-2 Punkte (<i>negativ</i>)
1 Punkt (<i>< 10 % positive Zellen</i>)	1 Punkt (<i>schwache Färbung</i>)	3-5 Punkte (<i>schwach positiv</i>)
2 Punkte (<i>10-50 % positive Zellen</i>)	2 Punkte (<i>mäßige Färbung</i>)	6-8 Punkte (<i>mäßig positiv</i>)
3 Punkte (<i>51-80 % positive Zellen</i>)	3 Punkte (<i>starke Färbung</i>)	9-12 Punkte (<i>stark positiv</i>)
4 Punkte (<i>> 80 % positive Zellen</i>)		

4.2.4.3 Prozentsatz Ki-67-positiver Zellkerne

Um die Proliferationsaktivität der malignen Lymphome einschätzen zu können, wurde von jedem Präparat der Anteil Ki-67-positiver Zellkerne bestimmt. Hierfür erfolgte eine immunhistochemische Färbung nach dem gleichen Vorgehen wie unter 4.2.2 beschrieben wurde. Verwendet wurde dazu der monoklonale Maus-Antikörper MIB-1 der Firma Dako in einer Verdünnung von 1:50.

Bei 400-facher Vergrößerung erfolgte die manuelle Auszählung der positiven und negativen Zellkerne von je 10 Hauptgesichtsfelder aus einem repräsentativen Tumorareal. Der Ki-67-Proliferationsindex wurde anschließend definiert als die Anzahl der Ki-67-positiven Kerne dividiert durch die Anzahl der gesamten Tumorzellen und wurde als Prozentsatz ausgedrückt. Bei einigen Präparaten war die Schnittfläche des Tumorgewebes zu klein, um 10 Hauptgesichtsfelder im Mikroskop einstellen zu können. Bei diesen Präparaten wurde die höchst mögliche Anzahl an Hauptgesichtsfeldern ausgewertet.

5 Ergebnisse

5.1 Patientendaten

Insgesamt wurden 101 in Paraffin eingebettete Tumorblöcke von 47 verschiedenen Patienten untersucht. Davon wurde von 15 Patienten je ein Tumorblock von dem Institut für Hämatopathologie in Kiel zur Verfügung gestellt. Weitere 86 Tumorblöcke von 32 Patienten stammten aus dem Labor für Zytologie und Pathologie in Bad Berka.

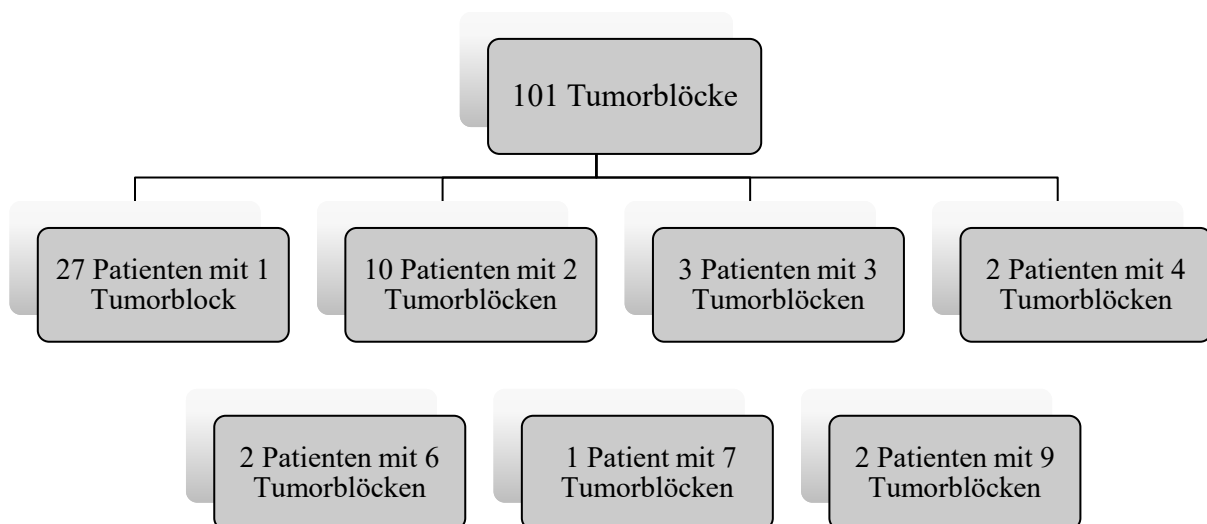


Abbildung 6: Anzahl der Tumorblöcke je Patient

Bei insgesamt 20 der Patienten lagen zwischen zwei und neun Tumorproben vor (siehe Abbildung 6). Die verschiedenen Gewebeproben waren zum Teil aus demselben Lymphknoten entnommen, teilweise kamen die Proben aus unterschiedlichen befallenen Lymphknoten oder Geweben. Von einem der Patienten lagen zum Beispiel drei Proben mit Milzgewebe und eine Probe aus dem Pankreas vor; von einem weiteren Patienten stammte einer der Tumorblöcke von einem Lymphknoten und ein weiterer enthielt Gewebe aus der Bauchwand. Drei Proben eines Patienten wurden basalen Lungensegmenten entnommen und bei zwei Patienten gab es je zwei Blöcke mit Gewebe aus der Magenhinterwand bzw. eines inguinalen Lymphknotens.

Aus den 101 Tumorblöcken wurden insgesamt je sieben Gewebeschnitte angefertigt und mittels immunhistochemischer Färbung auf die Somatostatin-Rezeptoren 1 bis 5, CXCR4 und Ki-67 hin untersucht. Lagen mehrere Tumorblöcke eines Patienten vor, wurde aus den einzelnen Werten je ein Mittelwert gebildet, sodass für jeden Patienten am Ende genau ein IRS-Wert pro Rezeptor und ein Ki-67-Index feststand.

Klassifikation

Nur bei sechs der Patienten mit einem NHL war eine genauere Klassifikation des Lymphoms angegeben. Unter den untersuchten Proben befanden sich drei B-Zell-Leukämien, zwei Mantelzelllymphome und ein Marginalzonenlymphom. Die restlichen NHL wurden lediglich der Untergruppe der B-Zell-Lymphome (37) oder T-Zell-Lymphome (2) zugeordnet und gelten daher als „*not otherwise specified*“ (NOS). Auch bei den beiden Hodgkin-Lymphomen war der histologische Subtyp nicht bekannt.

Die Gewebeproben teilten sich auf die einzelnen Tumorentitäten wie folgt auf (siehe Abbildung 7):

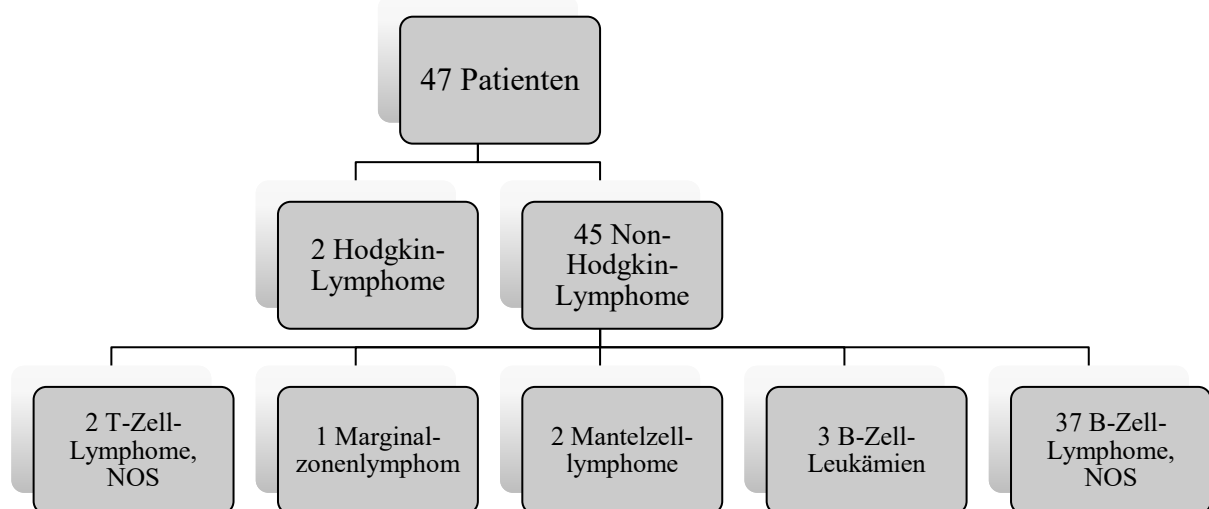


Abbildung 7: Verteilung der Tumorproben

NOS = not otherwise specified, nicht weiter spezifiziert

Tumorklassifikation

Bei den untersuchten Gewebeproben handelte es sich ausschließlich um Primärtumore. Die Proben stammten zum Großteil von Lymphknoten, die aus zervikalen, axillären oder inguinalen Bereichen entnommen worden waren (insgesamt 68,09 % der Fälle). Weiterhin waren 10 Proben aus dem Mediastinum, mit zum Teil angrenzendem Pleura- und

Lungengewebe, und 10 Proben von Tumor-befallenen abdominellen Organen (Leber, Milz, Magenhinterwand und Pankreas). Je zwei Proben stammten von einer Knochenmarksbiopsie, aus Hirngewebe und aus dem Mesenterium/Peritoneum. Die Probe des MCL war aus der Prostata entnommen worden (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Herkunft der Tumorproben

HL= Hodgkin-Lymphom; NHL = Non-Hodgkin-Lymphom; BZL = B-Zell-Lymphom; TZL = T-Zell-Lymphom; NOS = nicht weiter spezifiziert; MZL = Marginalzonenlymphom; MCL = Mantelzelllymphom; B-CLL = B- Zell-Leukämie; LK = Lymphknoten; GI-Trakt = Gastrointestinal-Trakt; KM = Knochenmark

Lokalisation	Entitäten (Anzahl)						
	HL	NHL	BZL, NOS	TZL, NOS	MZL	MCL	B-CLL
LK oberhalb des Diaphragmas							
zervikal/axillär	0	9	8	0	0	0	1
mediastinal/pulmonal	1	9	8	0	1	0	0
LK unterhalb des Diaphragmas							
mesenterial/peritoneal	0	2	1	0	0	0	1
inguinal	0	11	8	2	0	1	0
Abdomineller Organbefall (GI-Trakt, Pankreas, Milz, Leber)	1	9	8	0	0	0	1
KM-Biopsie	0	2	2	0	0	0	0
Hirngewebe	0	2	2	0	0	0	0
Prostatagewebe	0	1	0	0	0	1	0

Altersverteilung

Zum Diagnosezeitpunkt lag das mediane Durchschnittsalter der Patienten bei 67,6 Jahren. Die Altersspanne betrug 60 Jahre, wobei der jüngste Patient im Alter von 27 Jahren mit einem Lymphom diagnostiziert wurde und der älteste Patient zum Zeitpunkt der Erstdiagnose 87 Jahre alt war. Aus Abbildung 8 wird ersichtlich, dass die Mehrheit der Patienten den Altersgruppen zwischen 60 und 69 (29,79 %) sowie zwischen 70 und 79 (31;19 %) zugeordnet werden konnte.

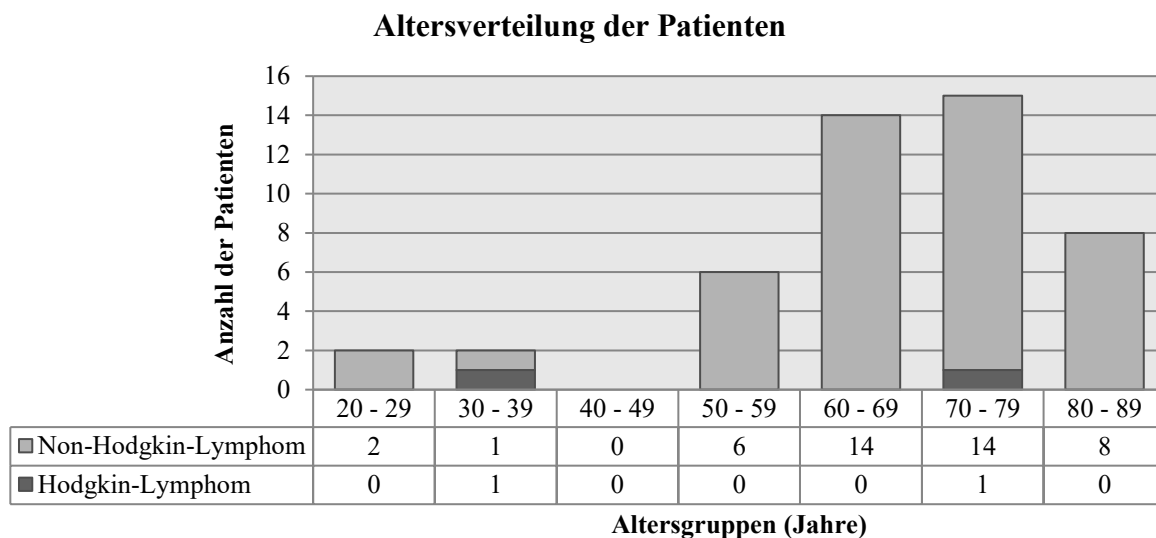


Abbildung 8: Altersverteilung der Patienten, aufgliedert nach Altersgruppen

Geschlechtsverteilung

Die Proben stammten von 18 weiblichen und 29 männlichen Patienten. Beide HL-Patienten waren Frauen. Unter den NHL waren 35,6 % der Patienten weiblichen Geschlechts und die restlichen 64,4 % waren Männer (siehe Abbildung 9).

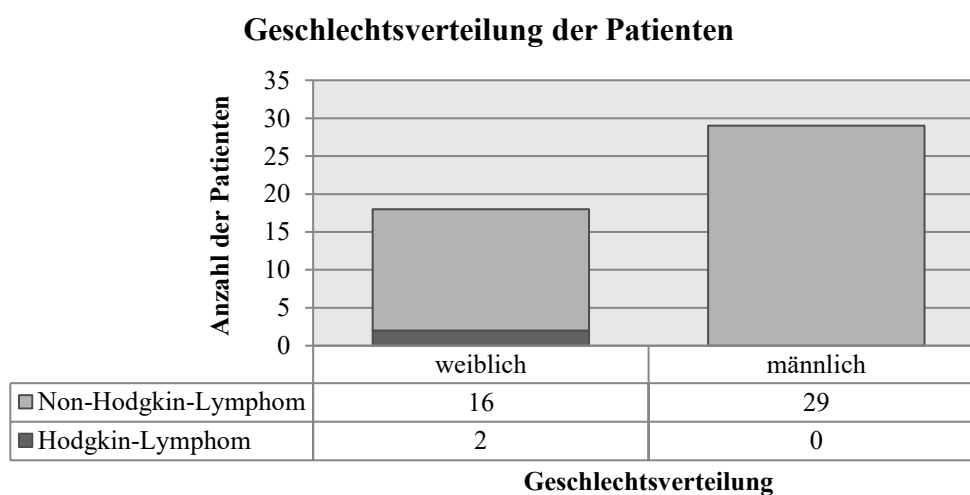


Abbildung 9: Geschlechtsverteilung der Patienten

Grading/Überleben/Rezidive

Die Tumore von sechs Patienten mit B-Zell-Lymphom wurden dem Grad I nach Ann Arbor zugeordnet, vier der B-Zell-Lymphome befanden sich im Grad III. Von den restlichen NHL- und den beiden HL-Proben war das Grading der Erkrankung nicht bekannt.

Bei drei der untersuchten Tumore handelte es sich um Rezidive eines NHL, die 3, 5 bzw. 13 Jahre nach der Erstdiagnose aufgetreten waren. Zwei Patienten waren zum Untersuchungszeitpunkt der Proben bereits verstorben. Nach der Erstdiagnose betrug ihre Überlebenszeit noch 11 bzw. 24 Monate.

5.2 Immunhistochemie

5.2.1 Auswertung der Somatostatinrezeptor-Färbung

Mittels immunhistochemischer Färbung wurden die Präparate auf die Expression der fünf Subtypen der Somatostatinrezeptoren hin untersucht. Bei Patienten mit mehreren Tumorblöcken wurde aus den einzelnen IRS-Werten jeweils ein Mittelwert gebildet. Es wurden sowohl zytoplasmatische als auch membranständige Färbungen unterschiedlicher Intensitäten erzielt. Außerdem konnte bei der Auswertung eine starke Heterogenität der Anfärbung der Tumore beobachtet werden. Färbeartefakte, die teilweise an den Schnittträgern der Gewebeproben zu finden waren, gingen nicht mit in die Bewertung der Färbintensitäten ein.

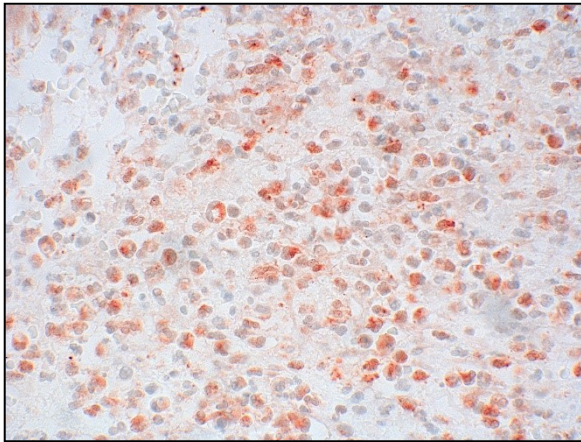
Die Beurteilung der Färbungen erfolgte mit Hilfe des Immunreaktiven Scores. Als positiv galten alle Werte größer zwei. Die Einteilung in schwach, mäßig und stark positiv ergab sich aus der Höhe des IRS-Wertes (siehe Kapitel 4.2.4).

SSTR1

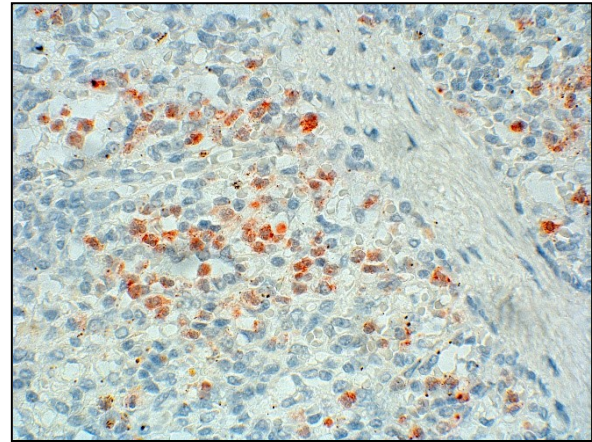
Der Somatostatinrezeptor SSTR1 konnte nur bei wenigen Lymphompräparaten nachgewiesen werden. Positive Zellen waren überwiegend vereinzelt sichtbar und wiesen durchweg eine zytoplasmatische Färbung auf. Die Intensität der Färbung zeigte sich von schwach bis stark (siehe Abbildung 10 A, B, C).

In den Schnitten der zwei untersuchten Knochenmarksbiopsien war ein Großteil der Lymphozyten und deren Vorläuferzellen positiv gefärbt. In nodalen Schnittpräparaten waren positiv gefärbte Zellen gehäuft im Interfollikularraum lokalisiert (siehe Abbildung 10 D). Auffällig war weiterhin, dass sich Leukozyten innerhalb von Blutgefäßen stark positiv für den SSTR1 färbten. Vom morphologischen Aspekt her, handelt es sich hierbei am ehesten um neutrophile Granulozyten (siehe Abbildung 10 E). In allen Präparaten fanden sich zudem stark positiv gefärbte Mastzellen (siehe Abbildung 10 C).

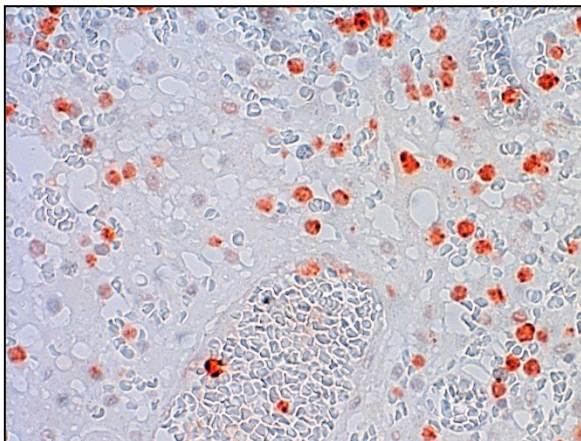
Im umliegenden Gewebe zeigten die exokrinen Pankreasinseln und Drüsenzellen des Magens eine starke Positivität für den SSTR1 (siehe Abbildung 10 F).



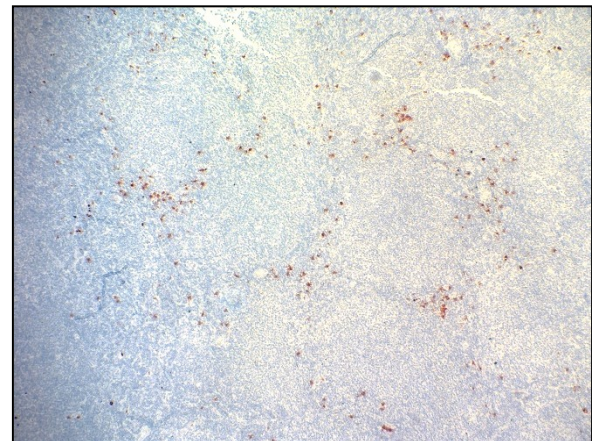
A SSTR1 – schwache zytoplasmatische Färbung



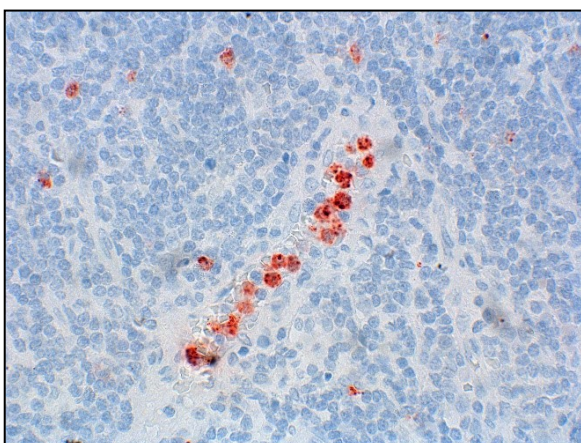
B SSTR1 – mäßige Färbung



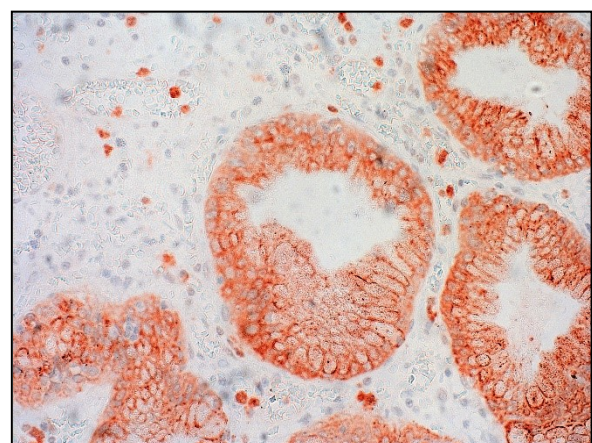
C SSTR1 – starke zytoplasmatische Färbung



D SSTR1 – interfollikuläre positive Zellen



E SSTR1 – stark gefärbte intravasale Zellen



F SSTR1 – starke membranständige Färbung von Magendrüsen

Abbildung 10: Immunhistochemische SSTR1-Färbung (rotbraun), Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: 630-fach (A, B, C, E), 400-fach (D, F). A, C, F: B-Zell-Lymphom der Magen hinterwand; B: B-Zell-Lymphom der Milz; D, E: B-Zell-Lymphom, axillärer Lymphknoten.

Keines der HL-Präparate exprimierte den SSTR1, wohingegen 8,8 % der NHL-Tumore diesen Subtypen aufwiesen (siehe Abbildung 11). Dabei handelte es sich ausschließlich um nicht näher klassifizierte B-Zell-Lymphome. Die Tumore von je einem Patienten (2,2 % der Fälle) wurden als schwach und stark positiv bewertet. Zwei weitere Patienten hatten eine mäßige Positivität für den SSTR1 (2,2 % der Fälle).

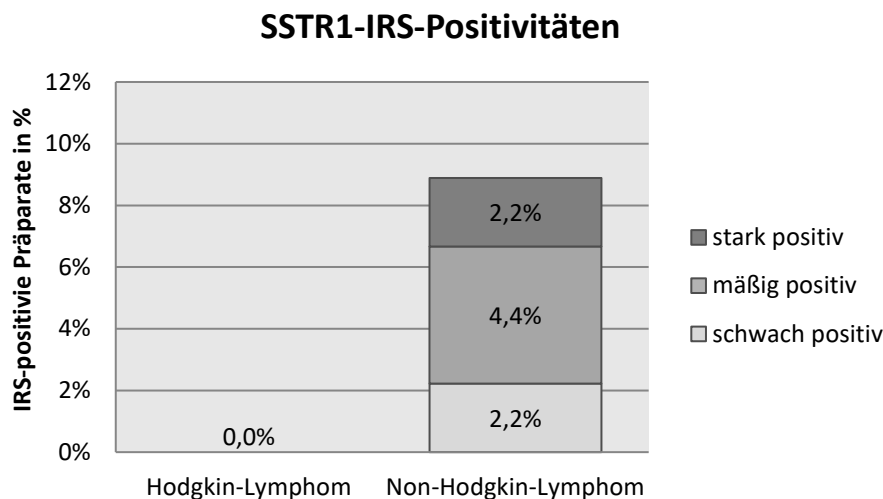
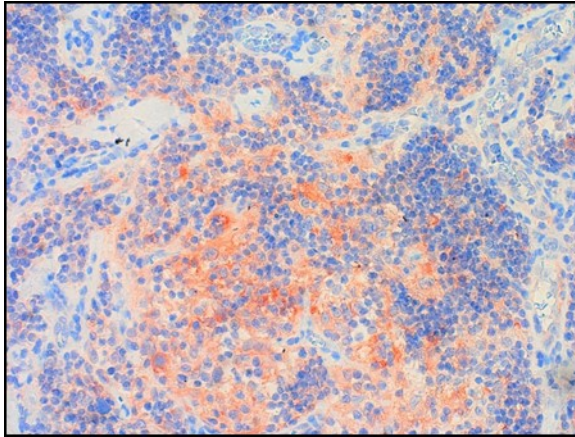


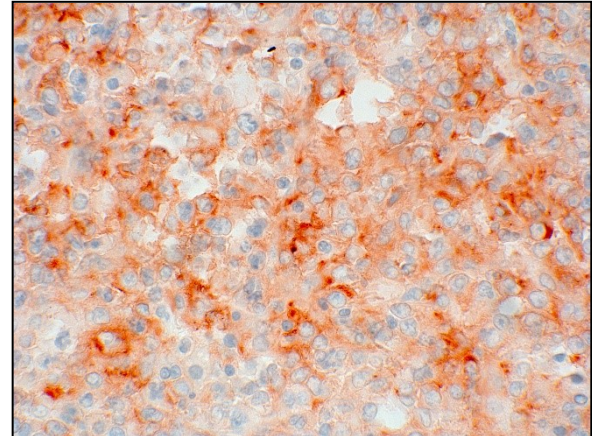
Abbildung 11: Darstellung der SSTR1-Positivitäten der Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome

SSTR2

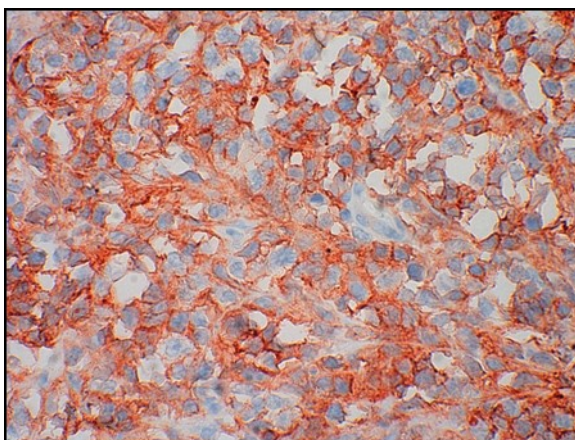
Mit dem monoklonalen Anti-SSTR2-Antikörper wurden in den Präparaten überwiegend membranständige Färbungen aller Intensitäten erreicht (siehe Abbildung 12 A, B, C). Die Verteilung innerhalb der Tumore war sehr variabel. In den meisten Präparaten kam es zu einer diffusen, aber meist inhomogenen Anfärbung. Die HL-Proben zeigten einzelne im Tumorgewebe verteilte Zellen, die den HSR-Zellen entsprechen (siehe Abbildung 12 E). Beim Betrachten des gesunden Gewebes, fanden sich positive Färbungen des Gefäßendothels, von Nervenzellen, von Beta-Zellen des Pankreas, von Zellen der Milz und von den Zellen des Keimzentrums der Lymphknoten (siehe Abbildung 12 D, F).



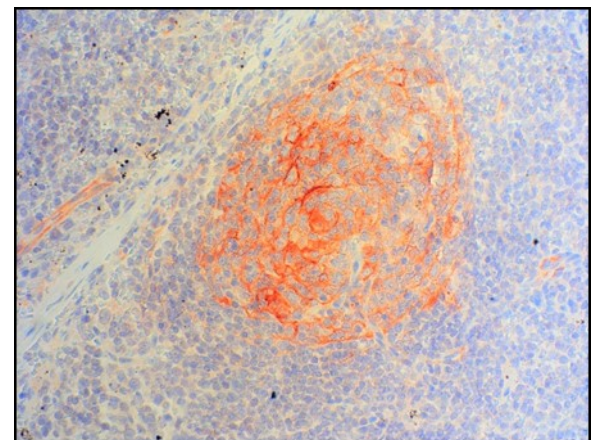
A SSTR2 – schwache Färbung



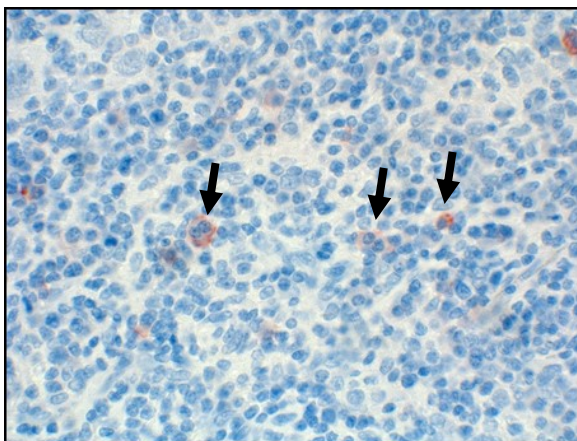
B SSTR2 – mäßige membranständige Färbung



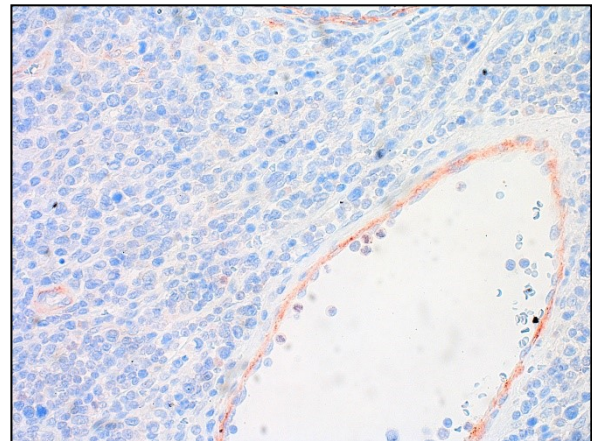
C SSTR2 – starke membranständige Färbung



D SSTR2 – Lymphknoten mit mäßig gefärbtem Keimzentrum



E SSTR2 – positiv gefärbte HSR-Zellen (Pfeile)



F SSTR2 – positiv gefärbtes Gefäßendothel

Abbildung 12: Immunhistochemische SSTR2-Färbung (rotbraun), Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: 630-fach (B, C, E), 400-fach (A, D, F). A, F: T-Zell-Lymphom, inguinaler Lymphknoten; B, C: B-Zell-Lymphom, Mediastinum; C, D: B-Zell-Lymphom, Lymphknoten der Leiste; E: Hodgkin-Lymphom, Lymphknoten aus Bereich der Arteria hepatica.

Mit einer IRS-Positivität bei insgesamt 13 der malignen Lymphome konnte der SSTR2 mehr als dreimal so oft nachgewiesen werden wie der SSTR1 (siehe Abbildung 13). Bei den NHL waren mäßige IRS-Positivitäten bei 13,3 % der Fälle am häufigsten zu beobachten. Darunter befand sich ein Präparat der B-Zell-Leukämien. 11,1 % der NHL waren schwach gefärbt, wobei ein Präparat als T-Zell-Lymphom klassifiziert war. Nur selten (bei 4,4 % der Proben) wurde bei den nicht weiter klassifizierten B-Zell-Lymphomen eine starke Rezeptorpositivität vermerkt.

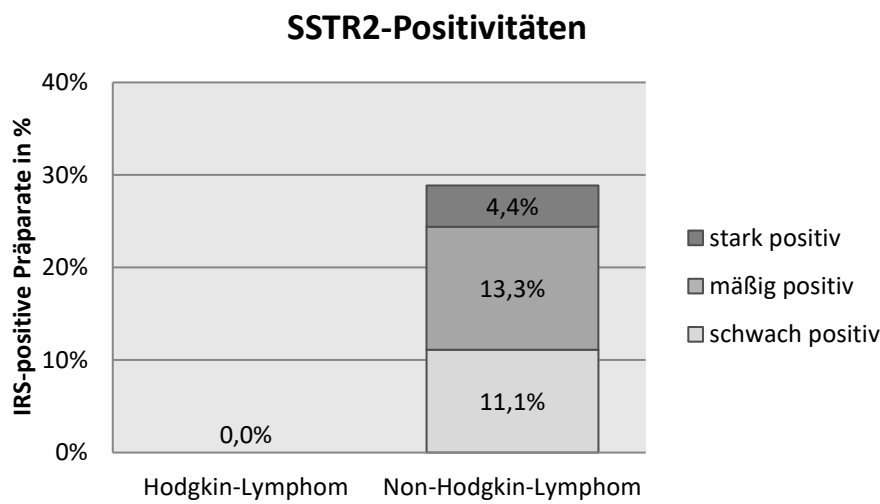
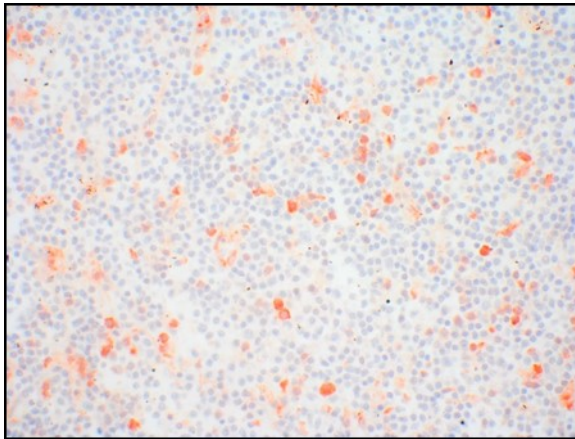


Abbildung 13: Darstellung der SSTR2-Positivitäten der Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome

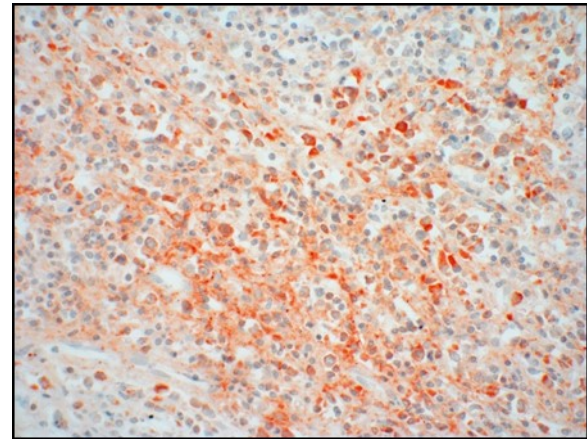
SSTR3

Positive Immunreaktionen für den SSTR3 waren überwiegend zytoplasmatisch (siehe Abbildung 14 A). Das Tumorgewebe färbte sich überwiegend mit einer schwachen bis mäßigen Intensität an. Positive Immunsignale waren homogen und inhomogen verteilt. Gehäuft kam es in den Präparaten zu einer zunehmenden Färbereaktion in den Randbereichen der Tumore.

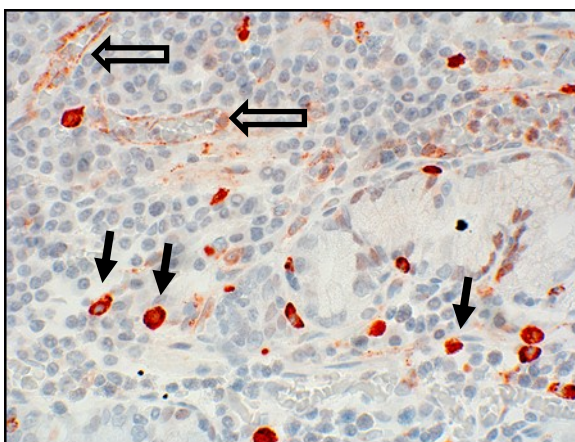
In einigen Präparaten wies das Gefäßendothel eine positive Immunreaktion für den SSTR3 auf. Ansonsten zeigten Makrophagen und Mastzellen eine SSTR3-Positivität. Sie imponierten in den Präparaten mit einer starken Färbung (siehe Abbildung 14 C). Eine Färbung von weiteren nicht-malignen Zellen wurde nicht beobachtet.



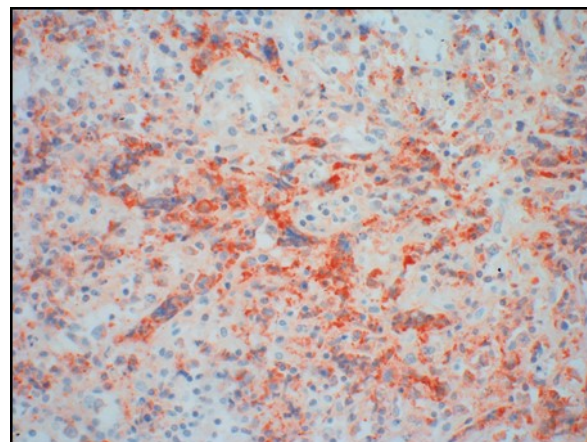
A SSTR3 – schwache zytoplasmatische Färbung



B SSTR3 – mäßige Färbung



C SSTR3 – starke Färbung einzelner Mastzellen (schwarze Pfeile), positiv gefärbtes Gefäßendothel (weiße Pfeile)



D SSTR3 – inhomogene Färbung

Abbildung 14: Immunhistochemische SSTR3-Färbung (rotbraun), Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: 400-fach (A, B, D), 630-fach (C). A: Non-Hodgkin-Lymphom, Resektat der Milz; B, D: B-Zell-Lymphom, Lymphknoten der Axilla; C: B-Zell-Lymphom der Magenhinterwand.

Wie auch schon bei den Untersuchungen des SSTR1 und SSTR2, wurde bei der immunhistochemischen Auswertung des SSTR3 bei keinem der Hodgkin-Lymphome eine Positivität für den Rezeptor sichtbar. Jedoch waren 22,3 % der NHL für diesen Rezeptortyp positiv (siehe Abbildung 15). Der überwiegende Anteil davon (15,6 % der Fälle) war nur schwach gefärbt, drei Präparate erreichten eine mäßige Intensität. Starke IRS-positive Präparate für den SSTR3 wurden nicht dokumentiert. Alle positiven Präparate gehörten den nicht weiter klassifizierten B-Zell-Lymphomen an.

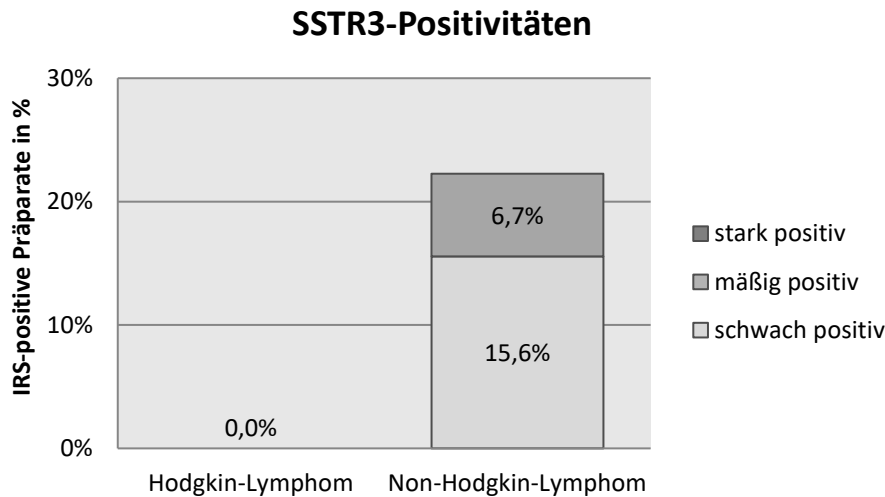
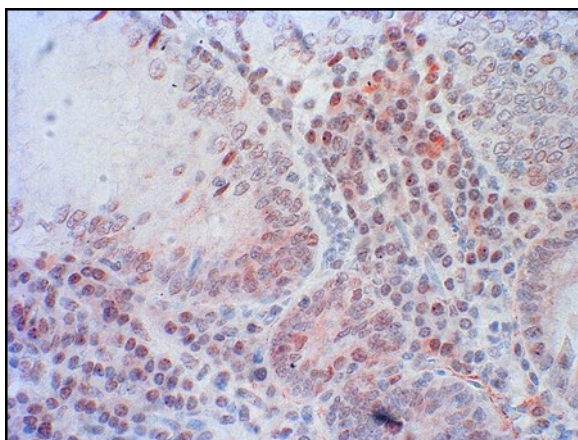


Abbildung 15: Darstellung der SSTR3-Positivitäten der Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome

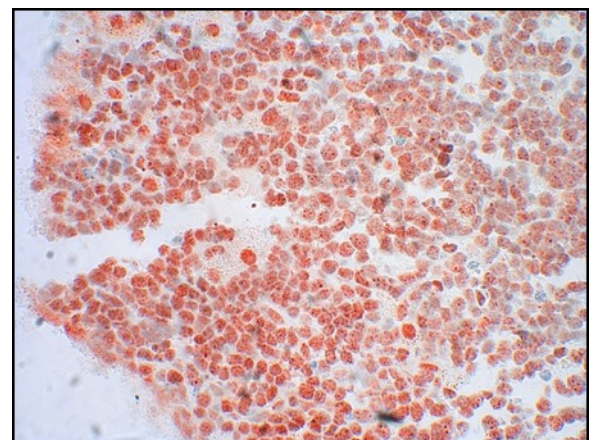
SSTR4

Keines der malignen Lymphome zeigte sich positiv für den Subtyp SSTR4. Lediglich in wenigen Bereichen der Präparate konnte eine sehr schwache zytoplasmatische Färbung verzeichnet werden. Allerdings konnte kein IRS mit einem Wert größer zwei ermittelt werden. Viele Schnitte wiesen zum Teil starke unspezifische Randfärbungen auf. Diese wurden, da sie hauptsächlich nukleär waren, als Artefakte betrachtet und nicht als positive Zellfärbung gewertet (siehe Abbildung 16 B).

Im umliegenden Gewebe zeigten Zellen der Magenschleimhaut eine schwache zytoplasmatische Färbung (siehe Abbildung 16 A).



A SSTR4 – schwache zytoplasmatische Färbung



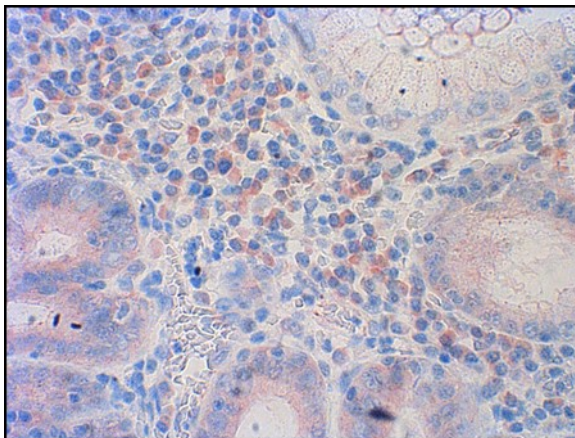
B SSTR4 - unspezifische Randfärbung

Abbildung 16: Immunhistochemische SSTR4-Färbung (rotbraun), Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: 630-fach (A), 400-fach (B). A, B: B-Zell-Lymphom der Magenhinterwand.

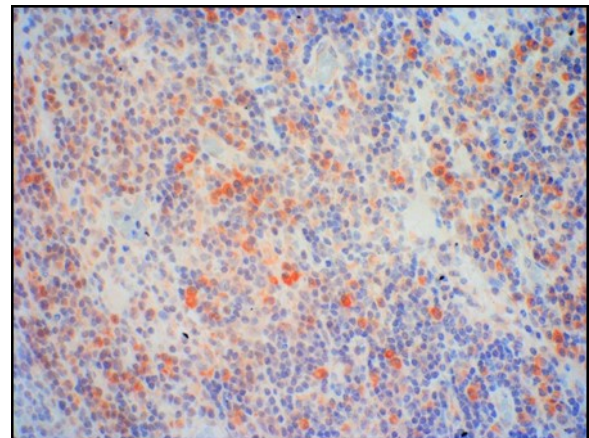
SSTR5

Die Immunfärbung für den SSTR5 zeigte im Tumorgewebe überwiegend zytoplasmatisch gefärbte Zellen. Diese waren entweder einzeln mit einer starken Intensität zu sehen oder lagen diffus in kleinen Ansammlungen im Gewebe verteilt vor (siehe Abbildung 17 A, B, C). SSTR5-positive Präparate konnten nur bei den HL gefunden werden. Im Gegensatz dazu erreichte keines der NHL-Präparaten einen IRS-Wert > 2.

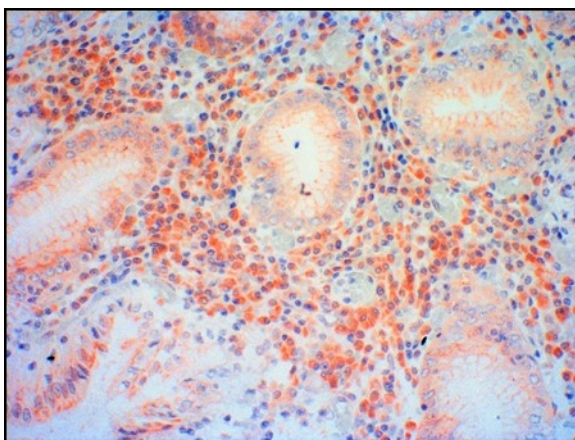
Eine meist starke SSTR5-Immunfärbung zeigte dagegen das Gefäßendothel. Im gesunden Gewebe fiel weiterhin eine Färbung von Drüsenzellen auf, besonders im Bereich der Magenschleimhaut. Hier kam es vor allem luminal zu einer membranständigen Färbereaktion. Im Pankreas waren die Drüsenzellen des exokrinen Anteils schwach bis mäßig gefärbt. Die endokrinen Anteile fielen durch eine membranständige Färbung auf, während exokrine Drüsenzellen zytoplasmatisch gefärbt waren (siehe Abbildung 17 D). Eine positive Färbung war ebenfalls in den Bronchialdrüsen in der Lunge sichtbar.



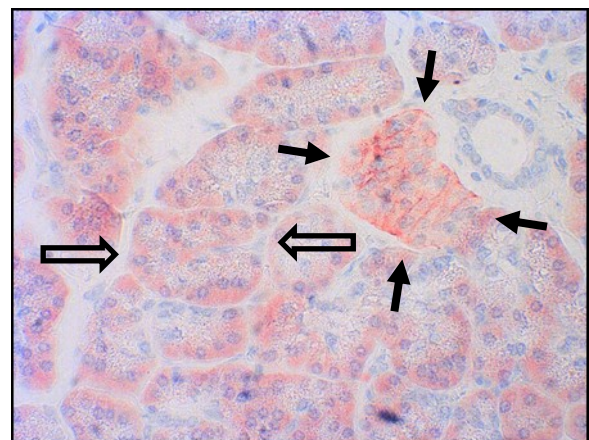
A SSTR5 – schwache zytoplasmatische Färbung



B SSTR5 – mäßige Färbung



C SSTR5 – starke Färbung



D SSTR5 – exokrines (weiße Pfeile) und endokrines (schwarze Pfeile) Pankreas

Abbildung 17: Immunhistochemische SSTR5-Färbung (rotbraun), Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: 630-fach (A, D); 400-fach (B, C). A, C: B-Zell-Lymphom der Magenhinterwand; B: Hodgkin-Lymphom, Lymphknoten der Leiste; D: B-Zell-Lymphom, Pankreasresektat.

Der SSTR5 konnte bei beiden Hodgkin-Lymphomen mit schwacher Positivität nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18). Im Gegensatz dazu war keines der NHL positiv für diesen Rezeptorsubtyp.

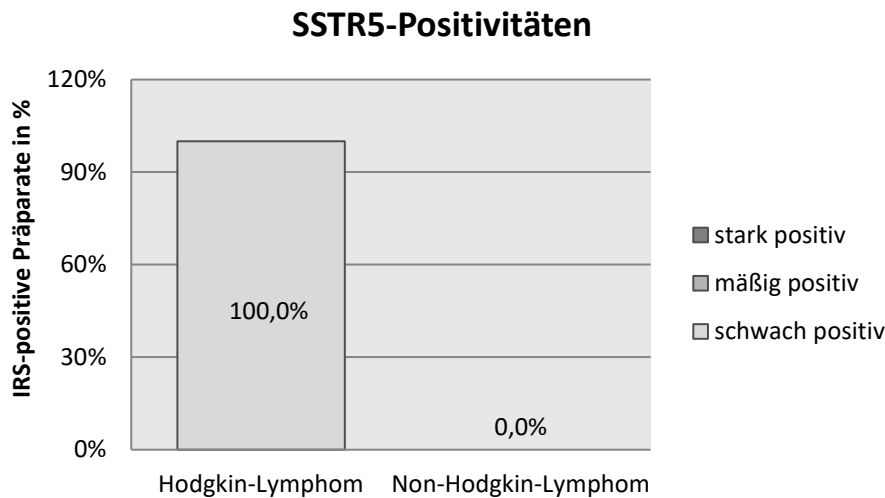
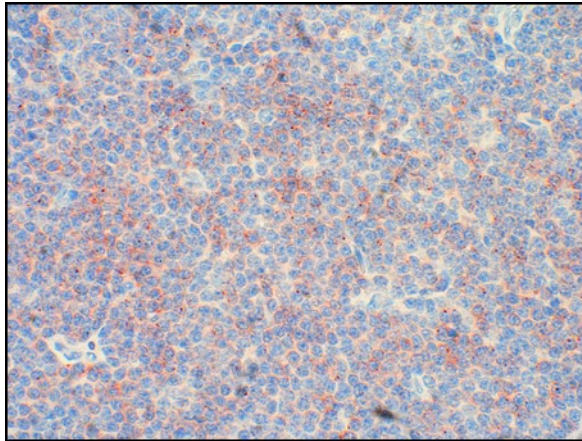


Abbildung 18: Darstellung der SSTR5-Positivitäten der Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome

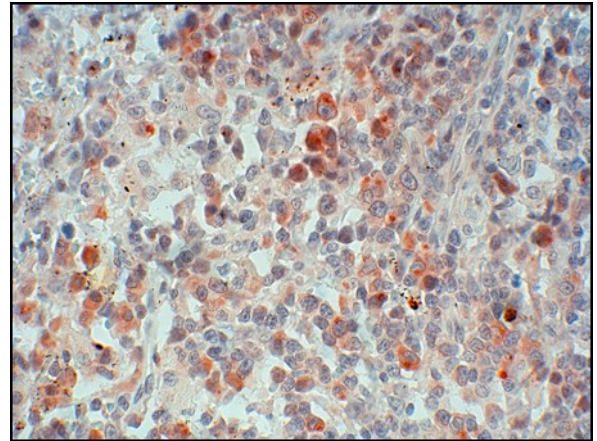
5.2.2 Auswertung der CXCR4-Färbung

Bei der Auswertung des CXCR4 wurden homogene und inhomogene Immunreaktionen beobachtet (siehe Abbildung 19 D, E). Diese zeigten eine schwache bis starke Intensität (siehe Abbildung 19 A, B, C). Es wurden fast durchweg membranständige Färbungen erreicht. Nur vereinzelt kamen zytoplasmatische Färbereaktionen vor. Diese waren meist fokal verteilt bei vereinzelter Zellen zu finden und von mäßiger Intensität (siehe Abbildung 19 B). Bei einigen Tumoren kam es ebenfalls zu verstärkten Färbeintensitäten in Randbereichen des Tumors. Diese könnten Proliferationsfronten entsprechen (siehe Abbildung 19 F, G).

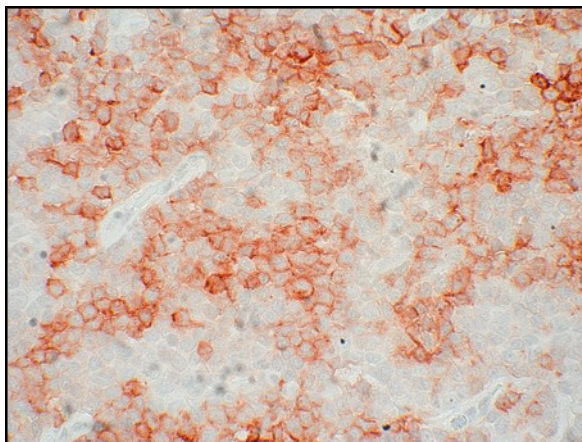
In den Lymphknoten selbst zeigten die Follikelzentren vermehrt, aber nicht bei allen Präparaten, CXCR4-positive Zellen (siehe Abbildung 19 H). Ansonsten ließ sich in den untersuchten umliegenden Geweben keine Immunreaktion beobachten.



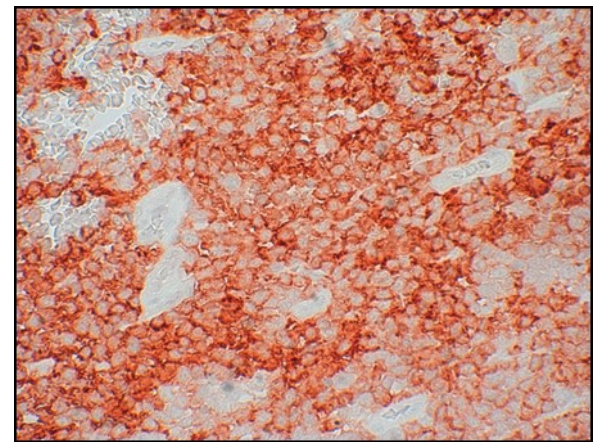
A CXCR4 – schwache Färbung



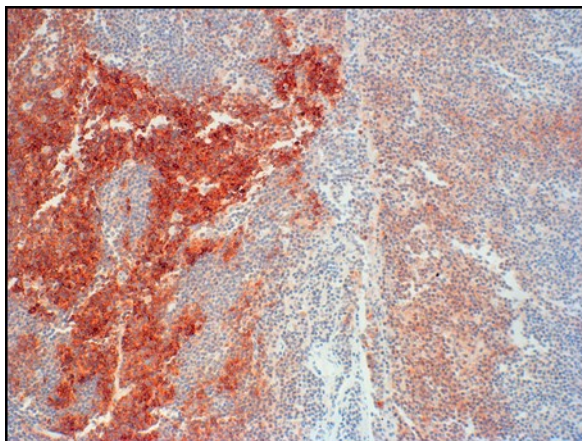
B CXCR4 – mäßige zytoplasmatische Färbung



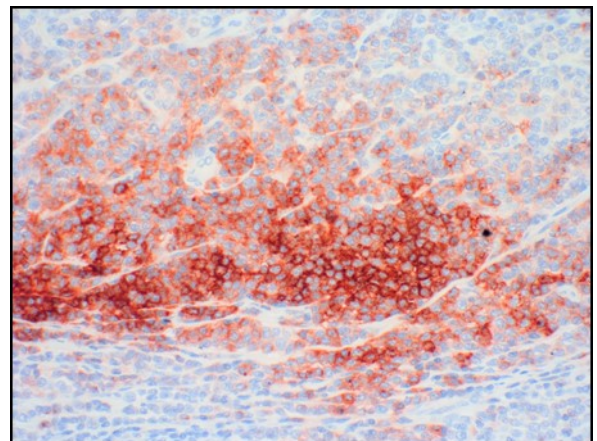
C CXCR4 – mäßige membranständige Färbung



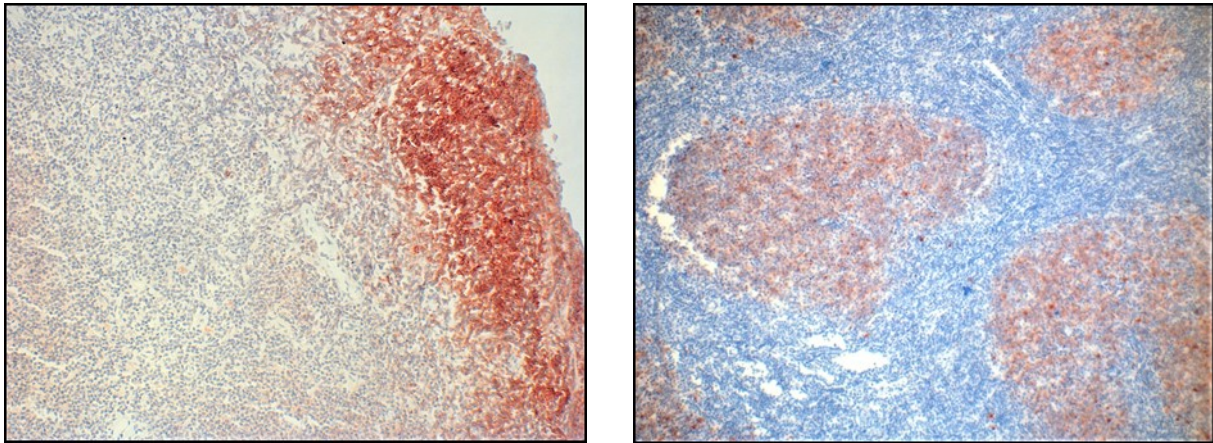
D CXCR4 – starke membranständige Färbung



E CXCR4 – inhomogene Färbung



F CXCR4 – zum Rand zunehmende Färbung



G CXCR4 – Proliferationsfront

H CXCR4 – positiv gefärbte Lymphfollikel

Abbildung 19: Immunhistochemische CXCR4-Färbung (rotbraun), Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: 630-fach (A, B, C, D), 400-fach (E, F, G, H). A: B-Zell-Lymphom, Lymphknoten der Bauchwand; B, C, D, F: B-Zell-Lymphom, Lymphknoten der Leiste; E, G: Mantelzelllymphom, Prostataresektat; H: B-Zell-Lymphom, supraclavikulärer Lymphknoten.

Von allen untersuchten Rezeptoren trat der CXCR4 in den Lymphompräparaten am häufigsten auf. Bei einem HL und bei fast der Hälfte der NHL-Präparate (48,9 % der Fälle) konnte für den CXCR4 eine positive Färbereaktion verzeichnet werden. Darunter befanden sich beide Mantelzelllymphome, eines der T-Zell-Lymphome und ein Präparat der akuten lymphathischen Leukämie. Das Immunsignal war größtenteils von schwacher bis mäßiger Intensität. Bei 8,9 % der Präparate ließ sich sogar eine starke Färbereaktion mit einem IRS von 12 ermitteln (siehe Abbildung 20).

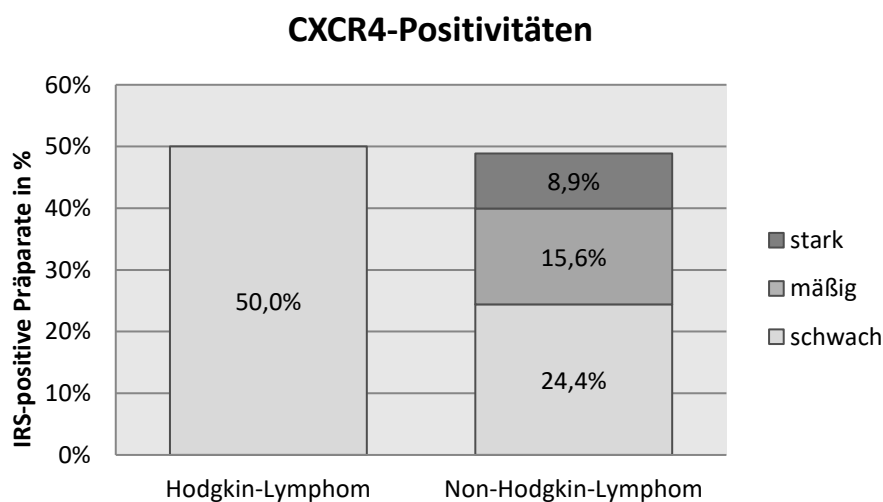
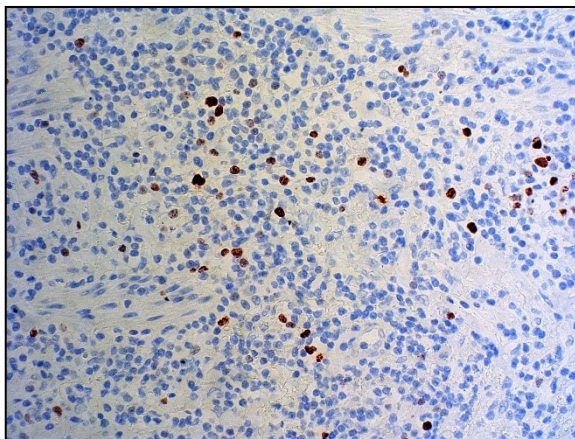


Abbildung 20: Darstellung der CXCR4-Positivitäten der Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome

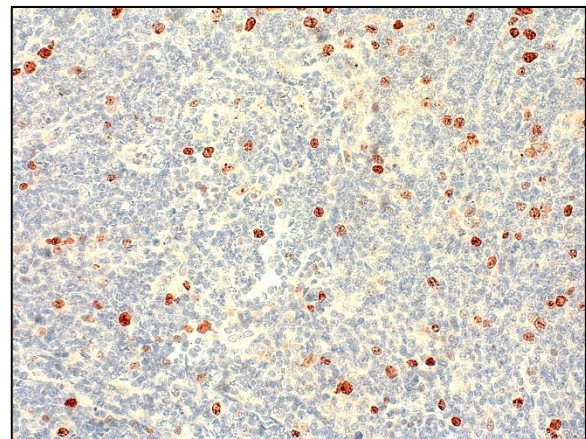
5.2.3 Auswertung der Ki-67-Färbung

Für die Auswertung der Tumorproben in Bezug auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 wurden pro Präparat 10 Hauptgesichtsfelder mit einem Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung betrachtet. Nur Zellen mit einer kräftigen rotbraunen Kernfärbung wurden als Ki-67-positiv gewertet.

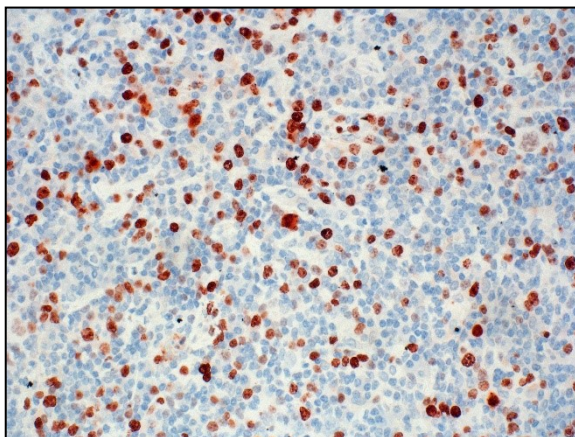
Beim Vorhandensein mehrerer Proben für einen Patienten wurde im Anschluss ein Mittelwert gebildet, sodass jedem Patienten genau ein Ki-67-Wert zugeordnet wurde.



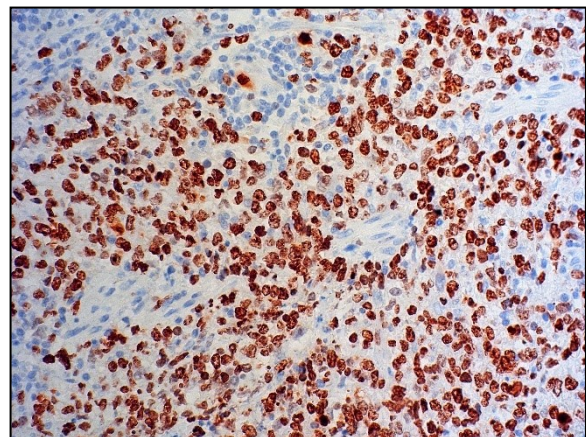
A Ki-67-Index: 3 %



B Ki-67-Index: 10 %



C Ki-67-Index: 40 %



D Ki-67-Index: 80%

Abbildung 21: Immunhistochemische Ki-67-Färbung (rotbraun), Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung: 400-fach, A, B, D: B-Zell-Lymphome; C: Hodgkin-Lymphom.

Die untersuchten Tumore zeigten sehr unterschiedliche Ki-67-Indizes. Während es Proben gab, in denen nur wenige Ki-67-positive Kerne zu sehen waren (siehe Abbildung 21 A), wiesen andere Präparate einen sehr hohen Ki-67-Index auf (siehe Abbildung 21 D). Die

Auswertung der Ki-67-positiven Kerne ergab maximale Werte von 77,85 %. Der minimal erreichte Wert lag bei 1,19 %.

Zum Teil gab es auch große intratumorale Unterschiede. So hatte ein Schnitt eines Tumors einen Wert von 16,36 % und eine weitere Probe desselben Tumors nur einen Wert von 0,16 %. Auch innerhalb der einzelnen Schnittpräparate war die Ki-67-Expression sehr inhomogen. Präparate mit Proliferationsfronten zeigten in diesem Bereich eine besonders hohe Positivität, während im Inneren des Tumors nur eine geringe Ki-67-Expression nachweisbar war.

Die meisten Präparate wiesen einen Ki-67-Index zwischen 21 % und 40 % auf (31,9 % der Tumore). Bei 11 der Tumoren lag der Ki-67-Index zwischen 11 % und 20 %, bei 13 Tumoren unter 10 %. Nur sechs der NHL-Tumore hatten einen Ki-67-Index über 40 %. Die HL-Präparate erreichten mit 14,28 % und 21,28 % insgesamt mittlere Ki-67-Werte (siehe Abbildung 22).

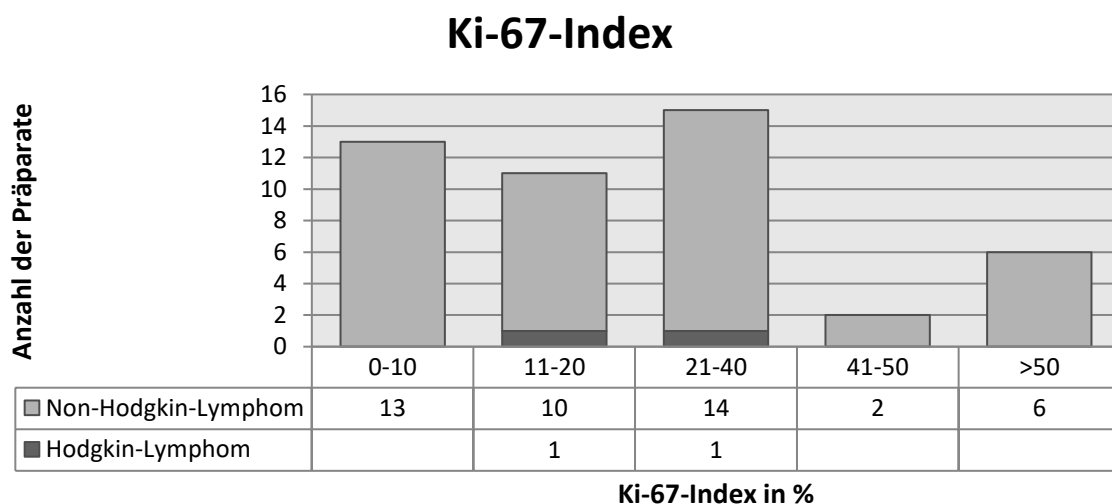


Abbildung 22: Ki-67-Index der untersuchten Präparate

5.2.4 Häufigkeitsverteilungen und Stärke der Rezeptorpositivitäten

Da insgesamt pro Rezeptor 101 Gewebeschnitte von 47 Patienten vorlagen, wurde beim Vorhandensein mehrerer Gewebeproben und -schnitte eines Patienten je ein Mittelwert für den IRS-Wert der jeweiligen SST-Rezeptoren und des CXCR4 gebildet. Der IRS wurde bei Werten > 2 als positiv gewertet. Werte von 0, 1 und 2 wurden als negativ eingestuft.

Häufigkeitsverteilung

In Abbildung 23 ist die Häufigkeitsverteilung der SSTR-Subtypen und des CXCR4 anhand der IRS-positiven Tumore dargestellt. Insgesamt wurden alle Tumorproben auf die Expression eines jeden SSTR-Subtyps und den CXCR4 hin bewertet. Es konnte folgende Reihenfolge in der Häufigkeit einer Positivität der Tumore für die jeweiligen Rezeptoren ermittelt werden: CXCR4 > SSTR2 > SSTR3 > SSTR1 > SSTR5 > SSTR4.

Der CXCR4 war mit Abstand in den meisten Präparaten nachweisbar. Fast die Hälfte (48,94 % der Fälle) der Lymphompräparate zeigten eine positive Färbereaktion. Unter den verschiedenen SST-Rezeptorsubtypen war der SSTR2 mit 27,66 % der malignen Lymphome am häufigsten positiv., gefolgt vom SSTR3 und vom SSTR1, die bei zehn Patienten (21,28% der Fälle) bzw. 4 Patienten (8,51 % der Fälle) positiv waren. Nur zwei Präparate erzielten positive IRS-Werte für den SSTR5; beide gehörten zu der Entität der Hodgkin Lymphome. Der SSTR4 war bei allen untersuchten malignen Lymphomen negativ (siehe Abbildung 23).

Häufigkeitsverteilung der Rezeptorsubtypen der malignen Lymphome gesamt

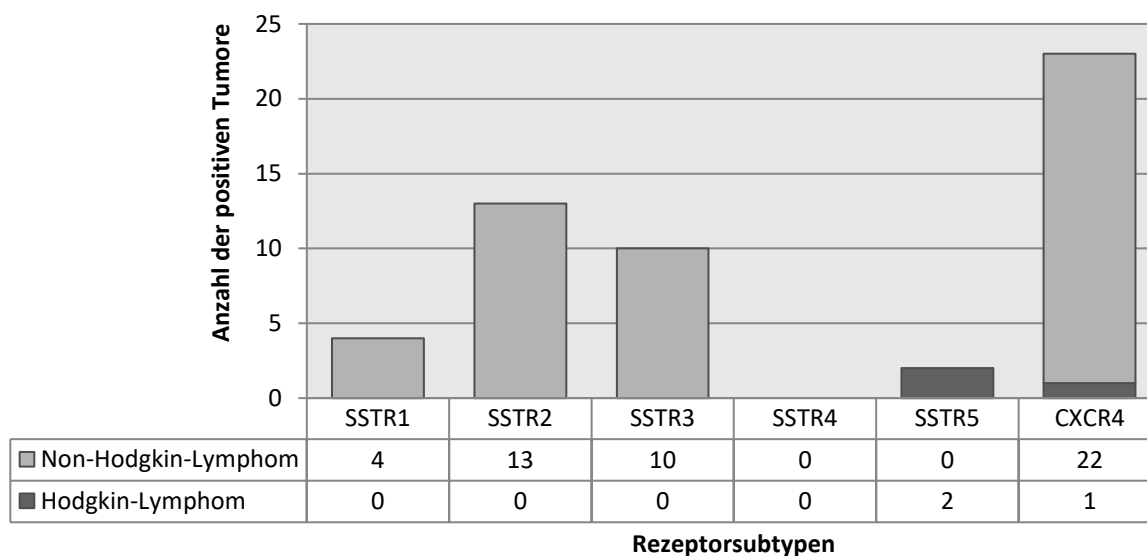


Abbildung 23: Häufigkeitsverteilung der Rezeptorsubtypen SSTR1-5 und des CXCR4

Stärke der Rezeptorpositivitäten

Die Stärke der Rezeptorpositivitäten wurde anhand der Höhe des erreichten IRS-Wertes bestimmt. Sie wird in schwach positiv (IRS-Wert 3-5), mäßig positiv (IRS-Wert 6-8) und stark positiv (IRS-Wert 9-12) untergliedert.

Präparate mit maximalen Werten von 12 und damit einer starken Rezeptorpositivität, konnten bei den Somatostatinrezeptoren SSTR1 und SSTR2 sowie dem CXCR4 nachgewiesen werden. Der SSTR3 erreichte einen maximalen Wert von 6, was einer mäßigen Positivität entspricht. Bei der immunhistochemischen Färbung des Subtypen SSTR5 lag der höchste IRS-Wert bei 4 und damit bei einer schwachen Positivität. Der maximal ermittelte IRS-Wert für den SSTR4 lag bei 2. Dieser Wert wird allerdings als Rezeptor-negativ gewertet (siehe Tabelle 15).

In Bezug auf die mittleren IRS-Werte, die für die einzelnen Rezeptoren ermittelt wurden, zeigte sich folgende Reihenfolge: CXCR4 > SSTR2 > SSTR3 > SSTR1 > SSTR5 > SSTR4. Da die Rezeptoren SSTR4 und SSTR5 bei den untersuchten Proben ohnehin keine oder nur sehr selten eine Immunreaktion zeigten, wiesen sie auch die niedrigsten Mittelwerte auf. Der höchste Mittelwert wurde von dem CXCR4 erreicht (3,43), gefolgt von dem SSTR2 (2,17) und dem SSTR3 (1,04).

Tabelle 15: Intensitäten der Immunfärbungen und Anzahl der IRS-Bewertungen (IRS >2) bei den untersuchten malignen Lymphomen gesamt

	IRS-Werte					
	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	CXCR4
Punktezahl						
Minimum	0	0	0	0	0	0
Maximum	12	12	6	2	4	12
Mittelwert	0,68	2,17	1,04	0,06	0,61	3,43
Positive Fälle						
Anzahl	4	13	10	0	2	23
Prozent	8,51	27,66	21,28	0,00	4,26	48,94

5.2.5 Expressionsmuster

Um zu ermitteln, ob die verschiedenen SST-Rezeptoren gehäuft gemeinsam zusammen oder in Zusammenhang mit dem CXCR4 auftreten, wurden die IRS-Positivitäten der Präparate als Expressionsmuster zusammengefasst. Positiv für einen Rezeptor sind die Präparate mit IRS-Bewertungen > 2. Werte von 0, 1 und 2 wurden als negativ eingestuft.

Maligne Lymphome gesamt

Bei den Lymphom-Präparaten wurden insgesamt 14 verschiedene Expressionsmuster ermittelt. Am häufigsten war die alleinige Expression des CXCR4 bei 29,79 % der untersuchten Tumore. Auch die Rezeptorsubtypen SSTR2 und SSTR3 kamen gehäuft einzeln

vor, ohne dass ein weiterer Rezeptor exprimiert wurde. Dies war bei sechs Patienten (12,77 % der Fälle) für den SSTR2 der Fall und bei vier Patienten (8,51 % der Fälle) für den SSTR3. Bei insgesamt 6,38 % der Fälle wurde der SSTR3 zusammen mit dem CXCR4 exprimiert. Jeweils 4,26 % der untersuchten Patienten wiesen eine kombinierte Expression des SSTR2 und des CXCR4 sowie des SSTR2 zusammen mit dem SSTR3 auf. Insgesamt traten sieben der Expressionsmuster nur bei einzelnen Präparaten auf. Neun der Präparate (19,15 % der Fälle) zeigten für keinen der untersuchten Rezeptoren einen IRS > 2 (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Expressionsmuster der SSTR und des CXCR4 bei allen untersuchten Tumoren
IRS = Immunreaktiver Score

Expressionsmuster						Häufigkeit	
SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	CXCR4	(Anzahl)	(%)
-	-	-	-	-	-	9	19,15 %
-	-	-	-	-	+	14	29,79 %
-	+	-	-	-	-	6	12,77 %
-	-	+	-	-	-	4	8,51 %
-	-	+	-	-	+	3	6,38 %
-	+	-	-	-	+	2	4,26 %
-	+	+	-	-	-	2	4,26 %
-	+	+	-	-	+	1	2,13 %
-	-	-	-	+	-	1	2,13 %
-	-	-	-	+	+	1	2,13 %
+	-	-	-	-	-	1	2,13 %
+	-	-	-	-	+	1	2,13 %
+	+	-	-	-	-	1	2,13 %
+	+	-	-	-	+	1	2,13 %

+ : Immunreaktiver-Score > 2
- : Immunreaktiver-Score ≤ 2

Non-Hodgkin-Lymphome

In Tabelle 17 sind die Expressionsmuster für die einzelnen NHL-Entitäten dargestellt. Sieben der nicht weiter spezifizierten B-Zell-Lymphome, das Marginalzonenlymphom und eine B-Zell-Leukämie waren für keinen der Rezeptoren positiv. In 27,03 % der Fälle der nicht weiter klassifizierten B-Zell-Lymphome wurde lediglich für den CXCR4 ein IRS > 2 diesen Rezeptor ermittelt. Je vier Patienten (10,81 % der Fälle) exprimierten den SSTR2 bzw. den SSTR3 als einzigen der untersuchten Rezeptoren. Für 8,11 % der Fälle wurden kombinierte positive Färbereaktionen für den SSTR3 und den CXCR4 erreicht. Jeweils zwei weitere Tumore der nicht weiter klassifizierten NHL wiesen Positivitäten für die Rezeptorsubtypen SSTR2 und CXCR4 sowie SSTR2 und SSTR3 auf. Innerhalb eines Tumors wurden maximal

drei der untersuchten Rezeptoren nachgewiesen. Dabei hatte einer der Patienten positive IRS-Werte für den SSTR2, SSTR3 und CXCR4; ein weiterer Patient für den SSTR1, SSTR2 und CXCR4.

Eines der Präparate der T-Zell-Lymphome war positiv für den CXCR4, das andere für den SSTR2. Beide Mantelzelllymphome und eine der B-Zell-Leukämien exprimierten ausschließlich den CXCR4. Die dritte B-Zell-Leukämie-Probe war positiv für den SSTR2.

Tabelle 17: Expressionsmuster der SSTR und des CXCR4 bei den Non-Hodgkin-Lymphomen
NOS = not otherwise specified, nicht weiter spezifiziert; IRS = Immunreaktiver-Score

Expressionsmuster						Häufigkeit	
SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	CXCR4	(Anzahl)	(%)
B-Zell-Lymphom, NOS (n = 37)							
-	-	-	-	-	-	7	18,92 %
-	-	-	-	-	+	10	27,03 %
-	-	+	-	-	-	4	10,81 %
-	+	-	-	-	-	4	10,81 %
-	-	+	-	-	+	3	8,11 %
-	+	-	-	-	+	2	5,41 %
-	+	+	-	-	-	2	5,41 %
-	+	+	-	-	+	1	2,70 %
+	-	-	-	-	-	1	2,70 %
+	-	-	-	-	+	1	2,70 %
+	+	-	-	-	-	1	2,70 %
+	+	-	-	-	+	1	2,70 %
T-Zell-Lymphom, NOS (n = 2)							
-	-	-	-	-	+	1	50,00 %
-	+	-	-	-	-	1	50,00 %
B-Zell-Leukämie (n = 3)							
-	-	-	-	-	-	1	33,33 %
-	-	-	-	-	+	1	33,33 %
-	+	-	-	-	-	1	33,33 %
Mantelzelllymphom (n = 2)							
-	-	-	-	-	+	2	100 %
Marginalzonenlymphom (n = 1)							
-	-	-	-	-	-	1	100 %
+ : Immunreaktiver-Score						> 2	
- : Immunreaktiver-Score						≤ 2	

Hodgkin Lymphome

Eines der HL-Präparate zeigte in der immunhistochemischen Auswertung eine Positivität für die Rezeptoren SSTR5 und CXCR4. Das zweite Präparat war lediglich für den SSTR5 positiv (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: Expressionsmuster der SSTR und des CXCR4 bei den Hodgkin-Lymphomen

IRS = Immunreaktiver Score

Expressionsmuster						Häufigkeit	
SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	CXCR4	IRS (Anzahl)	IRS (%)
-	-	-	-	+	+	1	50,00 %
-	-	-	-	+	-	1	50,00 %
+ : Immunreaktiver-Score		> 2					
- : Immunreaktiver-Score		≤ 2					

Tumorlokalisationen

Die Expressionsmuster der SSTR und des CXCR4 bei den unterschiedlichen Tumorlokalisationen sind in Tabelle 19 dargestellt.

Unter den LK-Präparaten waren die meisten Lymphome positiv für den CXCR4, darunter vier LK aus dem zervikalen und axillären Bereich und drei inguinale LK. Weitere drei Präparate aus inguinalen LK exprimierten lediglich den SSTR2.

Keines der Knochenmarkbiopsien war positiv für den CXCR4, allerdings exprimierten beide den SSTR1 und eines der Präparate war zusätzlich positiv für den SSTR2. Von den zwei analysierten Lymphomen aus dem Hirngewebe exprimierte eines CXCR4 und das andere den SSTR3. Das Lymphom der Prostata erreichte lediglich für den CXCR4 einen positiven IRS-Wert.

Tabelle 19: Expressionsmuster der SSTR und des CXCR4 gegliedert nach der Tumorlokalisation

IRS = Immunreaktiver Score

Expressionsmuster						Häufigkeit	
SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	CXCR4	(Anzahl)	(%)
Zervikale/axilläre Lymphknoten (n = 9)							
-	-	-	-	-	-	3	33,33 %
-	-	-	-	-	+	4	44,44 %
-	+	-	-	-	-	1	11,11 %
-	+	+	-	-	+	1	11,11 %

Inguinale Lymphknoten (n = 11)							
-	-	-	-	-	-	2	18,18 %
-	-	-	-	-	+	3	27,27 %
-	+	-	-	-	-	3	27,27 %
-	-	+	-	-	+	1	9,09 %
+	-	-	-	-	+	1	9,09 %
+	+	-	-	-	+	1	9,09 %
Mediastinum/Lunge (n = 10)							
-	-	-	-	-	-	3	30,00 %
-	-	-	-	-	+	3	30,00 %
-	-	+	-	-	-	2	20,00 %
-	-	-	-	+	-	1	10,00 %
-	+	-	-	-	+	1	10,00 %
Mesenterium/Peritoneum (n = 2)							
-	-	-	-	-	-	1	50,00 %
-	+	-	-	-	-	1	50,00 %
Abdomineller Organbefall (n = 10)							
-	-	-	-	-	+	2	20,00 %
-	-	-	-	+	+	1	10,00 %
-	-	+	-	-	-	1	10,00 %
-	-	+	-	-	+	2	20,00 %
-	+	-	-	-	-	1	10,00 %
-	+	-	-	-	+	1	10,00 %
-	+	+	-	-	-	2	20,00 %
Knochenmarkbiopsie (n = 2)							
+	-	-	-	-	-	1	50,00 %
+	+	-	-	-	-	1	50,00 %
Hirngewebe (n = 2)							
-	-	-	-	-	+	1	50,00 %
-	-	+	-	-	-	1	50,00 %
Prostatagewebe (n = 1)							
-	-	-	-	-	+	1	100 %
+ : Immunreaktiver-Score > 2							
- : Immunreaktiver-Score ≤ 2							

5.2.6 Standardabweichungen

Die Auswertung der Expression der SST-Rezeptoren, des CXCR4 und des Ki-67 erbrachte bei den verschiedenen Gewebeproben eines Patienten teilweise unterschiedliche Ergebnisse. Da bei 20 Patienten zwischen zwei und neun Gewebeproben vorlagen (siehe Abbildung 6 Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.), wurden die Standardabweichungen bei den jeweiligen Färbungen ermittelt.

IRS-Werte der SSTR und des CXCR4

Die größte Streubreite kam bei den IRS-Werten des SSTR2 vor. Die maximale Standardabweichung lag bei einem Wert von 5,00. Auch die IRS-Werte des SSTR3 und des CXCR4 wiesen mit 3,00 bzw. 2,70 eine recht große maximale Standardabweichung auf.

Beim SSTR3 und dem SSTR5 kamen nur in 9,5 % der Fälle Standardabweichungen zwischen 2,01 und 3,00 vor. Eine maximale Standardabweichung von 0,00 beim SSTR4 lässt sich damit erklären, dass bei keinem der Patienten mit mehreren Schnitten für diesen Subtyp ein IRS-Score ≥ 2 vorlag. Jedoch hatte auch bei allen anderen Rezeptorsubtypen die Mehrheit der Patienten eine Standardabweichung von 0,00 und damit gleiche Expressionsintensitäten beim Vorliegen mehrerer Proben pro Patient (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Intraindividuelle Standardabweichung der IRS-Werte

n = Anzahl der Patienten mit mehreren Proben; SD_{Max}=maximale Standardabweichung

Standardabweichungen – IRS-Werte						
	0,00	0,00 – 1,00	1,01 - 2,00	2,01 - 3,00	> 3,01	SD _{Max}
SSTR1 (n = 20)	90,0 % (18)	-	10,0 % (2)	-	-	1,73
SSTR2 (n = 20)	55,5 % (11)	15,0 % (3)	15,0 % (3)	10,0 % (2)	5,0 % (1)	5,00
SSTR3 (n = 20)	70,0 % (14)	15,0 % (3)	-	15,0 % (3)	-	3,00
SSTR4 (n = 20)	100 % (20)	-	-	-	-	0,00
SSTR5 (n = 20)	60,0 % (12)	30,0 % (6)	10,0 % (2)	-	-	1,41
CXCR4 (n = 20)	40,0 % (8)	30,0 % (6)	25,0 % (5)	5,0 % (1)	-	2,70

Ki-67-Index

Die maximale Standardabweichung bei der Bestimmung der Ki-67-positiven Zellkerne lag bei 14,05 %. Jeweils 30,0 % der Proben hatten eine Standardabweichung zwischen 0,00 und 2,00 % bzw. zwischen 2,01 und 4,00 %. Lediglich bei zwei Patienten war eine Standardabweichung zwischen 6,01 und 8,00 % zu verzeichnen und nur bei zwei Patienten lag sie über 8,01 % (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21: Intraindividuelle Standardabweichung der Ki-67-Indizes

n = Anzahl der Patienten mit mehreren Proben; SD_{Max}=maximale Standardabweichung

Standardabweichungen – Ki-67-Index						
	0,00-2,00%	2,01-4,00 %	4,01-6,00 %	6,01-8,00 %	> 8,01 %	SD _{Max}
Ki-67-Index (n = 20)	30,0 % (6)	30,0 % (6)	20,0 % (4)	10,0 % (2)	10,0 % (2)	14,05 %

5.3 Korrelationen

Die statistischen Tests wurden mit SPSS der Version 25.0.0 durchgeführt. Als erstes wurden die Daten unter Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests auf eine Normalverteilung geprüft.

Hierbei konnte lediglich für das Alter der Patienten bei Erstdiagnose der Erkrankung eine Normalverteilung festgestellt werden.

5.3.1 Immunhistochemie und klinische Daten

Hodgkin-Lymphome versus Non-Hodgkin-Lymphome

Um herauszufinden, ob ein Unterschied zwischen den IRS-Werten der HL und der NHL besteht, wurde der Mann-Whitney-U-Tests benutzt (siehe Tabelle 22). Hierbei wurde für den SSTR5 ein signifikanter Unterschied festgestellt ($p = 0,003$). Die mittleren Ränge lagen bei 46,50 für die HL ($n = 2$) und bei 23,00 für die NHL ($n = 45$). Dabei bleibt zu berücksichtigen, dass nur zwei HL untersucht wurden. Ausschließlich diese Proben erreichten positive IRS-Werte für den SSTR5, die Intensität war allerdings schwach (IRS =3 bzw. 4 Punkte). Bei der Auswertung der NHL-Präparate konnte im Gegensatz dazu keine positive Färbereaktion beobachtet werden.

Für die restlichen Rezeptoren wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Entitäten berechnet ($0,297 < p < 0,908$).

Tabelle 22: Zusammenhang zwischen den Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen hinsichtlich der IRS-Werte der untersuchten Rezeptoren nach dem Mann-Whitney-U-Test; signifikante Werte sind hervorgehoben

	HL versus NHL					
	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	CXCR4
Mann-Whitney-U	37,000	43,000	28,000	43,000	,000	39,500
Z	-0,644	-0,116	-1,043	-0,301	-3,016	-0,293
p-Wert	0,519	0,908	0,297	0,763	0,003	0,770

B-Zell-Lymphome versus T-Zell-Lymphome

Zwischen den B- und den T-Zell-Lymphomen konnte für keinen der untersuchten Rezeptoren ein signifikanter Unterschied in den IRS-Werten gefunden werden (Mann-Whitney-U-Test: $0,318 < p < 0,917$).

Nodaler versus extranodaler Befall

Um herauszufinden, ob ein Unterschied zwischen der Höhe des Immunreaktiven Scores der untersuchten Rezeptoren und der Tumorlokalisation in nodalem oder extranodalem Gewebe (Lunge, abdominelle Organe, Knochenmarksbiopsie, Hirngewebe und Prostatagewebe) besteht, wurde ebenfalls der Mann-Whitney-U-Test benutzt (siehe Tabelle 23).

Die ermittelten IRS-Werte zeigten einen signifikanten Unterschied für den SSTR3 ($p = 0,038$). Dieser Rezeptorsubtyp erreichte höhere Werte bei extranodalem Gewebe ($n = 27$) mit einem mittleren Rang von 27,07 im Vergleich zu einem mittleren Rang von 19,95 für Proben, die von Lymphknoten entnommen wurden ($n = 20$). Insgesamt waren 8/27 extranodale Proben positiv für den SSTR3, während lediglich 2/20 der nodalen Läsionen den SSTR3 exprimierten.

Für die restlichen untersuchten Rezeptoren konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden ($0,219 < p < 0,832$).

Tabelle 23: Zusammenhang zwischen nodalem und extranodalem Befall hinsichtlich der IRS-Werte der untersuchten Rezeptoren nach dem Mann-Whitney-U-Test; signifikante Werte sind hervorgehoben

Nodaler versus extranodaler Tumorbefall						
	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	CXCR4
Mann-Whitney-U	239,500	261,000	187,000	250,000	243,500	219,000
Z	-1,003	-0,213	-2,078	-1,230	-0,725	-1,109
p-Wert	0,316	0,832	0,038	0,219	0,468	0,268

Supradiaphragmale versus infradiaphragmale Lymphknoten

Weiterhin wurden die Unterschiede der IRS-Werte zwischen Lymphknoten oberhalb und unterhalb des Diaphragmas betrachtet. Patienten mit Tumorproben von extranodalem Gewebe wurden hierbei nicht berücksichtigt.

Es konnte mit dem Mann-Whitney-U-Test für keinen der untersuchten Rezeptorsubtypen ein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden (siehe Tabelle 24). Für den SSTR1 wurde lediglich eine Tendenz festgestellt ($p = 0,082$) mit einer mittleren Effektstärke ($r = 0,31$). Die mittleren Ränge lagen bei 15,50 für supradiaphragmale Lymphknoten ($n = 19$) und 17,96 für Lymphknoten unterhalb des Zwerchfells ($n = 13$). Bei infradiaphragmalen Lymphknoten wurden demnach höhere Werte für den SSTR1 gefunden, die eine Tendenz zur Signifikanz zeigten. Insgesamt waren 15,38 % der infradiaphragmalen Proben positiv, während keiner der

Lymphknoten oberhalb des Diaphragmas den SSTR1 exprimierte.

Die übrigen Signifikanzen erreichten p-Werte zwischen 0,167 und 0,954.

Tabelle 24: Zusammenhang zwischen supra- und infradiaphragmalen Lymphknoten hinsichtlich der IRS-Werte der untersuchten Rezeptoren nach dem Mann-Whitney-U-Test; Tendenzen in kursiv

Supradiaphragmale versus infradiaphragmale Lymphknoten						
	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	CXCR4
Mann-Whitney-U	<i>104,500</i>	99,000	122,000	123,500	94,000	122,000
Z	<i>-1,737</i>	-1,038	-0,073	0,000	-1,383	-0,058
p-Wert	<i>0,082</i>	0,299	0,942	1,000	0,167	0,954

IRS versus Erkrankungsalter

Um zu überprüfen, ob eine Korrelation zwischen den IRS-Werten für die untersuchten Rezeptoren mit dem Alter der Patienten bei der Erstdiagnose ihrer Erkrankung besteht, wurde eine Spearman-Rangkorrelation erstellt.

Es ergaben sich folgende Werte: $-0,124 > r < 0,166$; $0,261 < p < 0,805$. Eine signifikante Korrelation wurde nicht gefunden.

Männer versus Frauen

Beim Vergleich der Rezeptorpositivitäten zwischen Männern und Frauen wurde im Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied der Expressionsstärke für den Rezeptorsubtyp CXCR4 festgestellt (siehe Tabelle 25). Der p-Wert lag mit 0,036 unterhalb des Signifikanzniveaus von 0,05. Der mittlere Rang der Frauen (n = 18) lag bei 18,72 und der mittlere Rang der Männer (n = 29) bei 27,28.

Die p-Werte der restlichen Rezeptoren lagen zwischen 0,260 und 0,856 und waren damit nicht signifikant.

Tabelle 25: Zusammenhang zwischen dem Geschlecht hinsichtlich der IRS-Werte der untersuchten Rezeptoren nach dem Mann-Whitney-U-Test; signifikante Werte sind hervorgehoben

Männer versus Frauen						
	SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	CXCR4
Mann-Whitney-U	241,500	222,000	225,500	243,000	254,500	166,000
Z	-0,652	-0,937	-0,904	-1,126	-0,181	-2,101
p-Wert	0,514	0,349	0,366	0,260	0,856	0,036

IRS versus Grading

Bei der Untersuchung der Immunreaktiven Scores wurden im Kendall-Tau-b-Test für die Somatostatinrezeptoren durchweg negative Korrelationen errechnet ($-0,414 < \tau_b < -0,083$) und für den CXCR4 ein positiver Korrelationskoeffizient von 0,409. Daraus kann geschlossen werden, dass Positivitäten für die Somatostatinrezeptoren mit einem geringeren Grading korrelieren und ein hoher Wert für den CXCR4 einen höheren Tumorgrad bedingt. Diese Zusammenhänge waren allerdings nicht signifikant ($0,188 < p < 0,414$).

5.3.2 Korrelationen zwischen den Somatostatinrezeptoren und dem CXCR4

Um herauszufinden, ob die Positivitäten der verschiedenen Rezeptorsubtypen und des CXCR4 miteinander korrelieren, wurde der Spearman-Test benutzt. Es konnte ermittelt werden, dass der SSTR5 und der SSTR2 signifikant miteinander in Beziehung stehen. Bei einem positiven Korrelationskoeffizienten ($r = 0,298$) ergab sich eine Signifikanz von 0,042. Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Auftreten des SSTR5 signifikant positiv mit dem SSTR2 korreliert.

Wie in Tabelle 26 ersichtlich wird, standen alle weiteren untersuchten Rezeptoren nicht in einer signifikanten Relation zueinander ($-0,147 < r < 0,129$; $0,323 < p < 0,983$).

Tabelle 26: Zusammenhang zwischen den SSTR-Subtypen und dem CXCR4 hinsichtlich der IRS-Werte nach dem Spearman-Test; r = Korrelationskoeffizient (Spearman); signifikante Werte sind hervorgehoben

Korrelationen zwischen den verschiedenen Rezeptorsubtypen						
		SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	CXCR4
SSTR1	r	0,053	0,070	-0,095	-0,025	-0,083
	p-Wert	0,723	0,638	0,526	0,867	0,579
SSTR2	r		0,017	0,060	0,298	-0,042
	p-Wert		0,908	0,686	0,042	0,777
SSTR3	r			0,128	-0,003	-0,147
	p-Wert			0,391	0,983	0,323
SSTR4	r				0,129	-0,046
	p-Wert				0,388	0,757
SSTR5	r					-0,051
	p-Wert					0,731

5.3.3 Immunhistochemie und Ki-67-Index

Ki-67-Werte der Tumorentitäten

Für die Auswertung der Ki-67-positiven Zellkerne mit den verschiedenen Tumorentitäten wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Verglichen wurden Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome, B- und T-Zell-Lymphome, nodale und extranodale Gewebeproben sowie supra- und infradiaphragmale Lymphknoten. Dabei konnten bei keinem Testpaar signifikante Unterschiede gefunden werden. Die Signifikanzen erreichten p-Werte zwischen 0,126 und 0,914.

Ki-67-Index und IRS

Mit Hilfe des Spearman-Tests wurden die IRS-Werte der verschiedenen Rezeptoren auf eine Korrelation mit der Höhe des Ki-67-Wertes geprüft (siehe Tabelle 27). Für den Rezeptorsubtypen SSTR4 konnte mit einem p-Wert von 0,045 eine signifikante Korrelation ermittelt werden. Es könnte angenommen werden, dass der IRS-Wert für diesen Rezeptor mit einem höheren Anteil Ki-67-positiver Kerne einhergeht ($r_{sp} = 0,294$). Allerdings wurden bei der Auswertung für den SSTR4 lediglich IRS-Werte zwischen null und zwei erreicht, die gemäß der Klassifikation nicht als positiv für die Rezeptorexpression gelten.

Für die restlichen Rezeptoren konnten keine signifikanten Korrelationen nachgewiesen werden ($-0,060 < r < 0,236$; $0,110 < p < 0,893$).

Tabelle 27: Zusammenhang zwischen dem Ki-67-Index und den IRS-Werten der untersuchten Rezeptoren nach dem Spearman-Test; r = Korrelationskoeffizient (Spearman); signifikante Werte sind hervorgehoben

Prozentsatz Ki-67-positiver Zellkerne versus IRS-Werte							
		SSTR1	SSTR2	SSTR3	SSTR4	SSTR5	CXCR4
Ki-67-Index	r	0,039	0,236	-0,060	0,294	-0,020	0,107
	p-Wert	0,797	0,110	0,688	0,045	0,893	0,475

Ki-67-Index und Grading/Überleben

Für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Grading und dem Überleben der Patienten wurden nur die NHL-Fälle berücksichtigt, da von den Patienten mit einem HL dazu keine Daten vorlagen.

Für das Überleben der Patienten wurde eine Spearman-Rangkorrelation durchgeführt (siehe Tabelle 28). Betrachtet wurde hierbei, ob die Patienten zum Untersuchungszeitpunkt bereits

verstorben waren oder nicht. Der Korrelationskoeffizient lag bei 0,324 und zeigte eine Signifikanz ($p = 0,030$). Daraus kann abgeleitet werden, dass ein hoher Anteil Ki-67-positiver Kerne im Tumor mit einem schlechteren Überleben korreliert.

Auch beim Grading der Non-Hodgkin-Lymphome konnte eine signifikante Korrelation mit dem Ki-67-Score festgestellt werden. Benutzt wurde der Kendall-Tau-b-Test ($\tau_b = 0,669$; $p = 0,019$). Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Grading der Tumore positiv mit der Höhe des Ki-67-Index korreliert.

Tabelle 28: Zusammenhänge zwischen dem Ki-67-Index und Überleben bzw. nach dem Spearman- bzw. Kendall-Tau-b-Test; r = Korrelationskoeffizient (Spearman); τ_b = Korrelationskoeffizient (Kendall-Tau-b); signifikante Werte sind hervorgehoben

Prozentsatz Ki-67-positiver Zellkerne versus Überleben und Grading			
		Überleben	Grading
Ki-67-Index	Korrelationskoeffizient	$r = 0,324$	$T_b = 0,669$
	p-Wert	0,030	0,019
	n	45	10

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von malignen Lymphomen auf die Expression der Rezeptoren SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4 und SSTR5 sowie des CXCR4. Weiterhin wurde der Ki-67-Proliferationsindex der verwendeten Proben bestimmt. Zur Verfügung standen dabei Präparate von insgesamt 47 verschiedenen Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen.

6.1 Alters- und Geschlechtsverteilung

Maligne Lymphome sind mit einigen Ausnahmen als Erkrankungen des Alters zu betrachten, was sich auch in den untersuchten Patientendaten widerspiegelte. Die Mehrheit der Patienten mit einem NHL war zum Diagnosezeitpunkt zwischen 60 und 80 Jahren alt. Dies entspricht den statistischen Angaben des Robert-Koch-Institutes, die ein mittleres Erkrankungsalter von 70 Jahren für Männer und 72 Jahren für Frauen angeben (Robert-Koch-Institut 2013b).

Außerdem wurde im Jahr 2010 in Deutschland ein größerer Männeranteil unter den NHL-Inzidenzen ermittelt. Es erkrankten 8.590 Männer und 7.640 Frauen (Robert-Koch-Institut 2013b). Auch in der vorliegenden Arbeit waren mehr Patienten mit einem NHL männlichen Geschlechts (64,4 % der Fälle).

Die für die HL beschriebene bimodale Altersinzidenz zwischen 15 und 35 Jahren sowie nach dem 60. Lebensjahr, kann auch bei den untersuchten HL-Proben nachvollzogen werden (Böcker et al. 2012). Eine Patientin erkrankte im Alter von 35 Jahren, die zweite Patientin mit 75 Jahren. Weiterhin wird eine Präferenz für Hodgkin-Lymphome für das männliche Geschlecht beschrieben, was für diese Arbeit nicht zutraf. Allerdings ist eine statistisch verwertbare Aussage mit lediglich zwei Proben nur begrenzt möglich.

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbungen wurde ein Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und der Expression von CXCR4 im Mann-Whitney-U-Test ermittelt ($p = 0,036$). Signifikant höhere IRS-Werte wurden bei Männern beobachtet. Im Kontrast dazu haben andere Untersuchungen bei DLBCL (Shin et al. 2014), MALT-Lymphomen (Stollberg et al. 2016) und anderen Malignomen (Kämmerer et al. 2015b, Liang et al. 2015) keinen Zusammenhang der CXCR4-Expression mit dem Geschlecht finden können.

6.2 Tumorlokalisierung

Statistisch gesehen kommen die HL am häufigsten in supradiaphragmalen Lymphknoten des Halsbereichs und des Mediastinums vor. Es war jedoch nur eine der beiden untersuchten Proben mediastinalen Ursprungs und damit oberhalb des Zwerchfells gelegen. Das andere Präparat wurde aus einem Lymphknoten im Bereich der Arteria hepatica entnommen. Dies ist ein eher untypischer Befall, da HL nur selten infradiaphragmal lokalisiert sind (Böcker et al. 2012).

Die Auswertung erbrachte weder für die NHL noch für die HL eine Korrelation bezüglich der Lokalisation der Tumorerkrankungen oberhalb oder unterhalb des Zwerchfells. Während der Literaturrecherche konnten keine Daten gefunden werden, die einen solchen Zusammenhang untersuchten, weshalb eine Einordnung derzeit nicht möglich ist. Es ist anzunehmen, dass die zellulären Eigenschaften der Lymphknoten nicht abhängig von deren Lokalisation sind, sondern vielmehr mit der Histologie des jeweiligen Gewebes korreliert.

Die Inzidenz extranodaler Lymphome hat in den letzten Jahrzehnten sowohl für HL als auch für NHL stetig zugenommen (Chiu und Weisenburger 2003, Glaser et al. 2015). In dieser Arbeit stammten 32 % der Präparate von extranodal befallenen Tumormanifestationen und die restlichen 68 % aus Lymphknotengewebe.

Die Zunahme von Lymphomen mit extranodaler Beteiligung kann zum Teil als Folge der verbesserten diagnostischen Möglichkeiten in den letzten Jahren gesehen werden. Sie kann aber auch durch die Entwicklung neuer immunphänotypischer und molekularer Methoden sowie die Klassifizierung zusätzlicher Subtypen erklärt werden.

Bei der Auswertung der IRS-Werte konnte im Mann-Whitney-U-Test ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression des SSTR3 und der Lokalisation der Gewebe gefunden werden ($p = 0,038$). Der SSTR3 wurde in der vorliegenden Arbeit in extranodalen Läsionen häufiger nachgewiesen als in Proben, die aus Lymphknoten entnommen wurden.

Die Literaturrecherche erbrachte nur wenige Daten über die SST-Rezeptorexpression im Zusammenhang mit der Tumorlokalisierung. Stollberg et al. (2016) fanden bei gastrischen MALT-Lymphomen höhere Expressionsraten von SSTR3, SSTR4 und SSTR5 als bei extragastrischen MALT-Lymphomen. Möglicherweise spielt der SSTR3 eine Rolle bei dem Manifestationsort der Tumorerkrankungen, da er auch in der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Expressionshäufigkeiten in Abhängigkeit von der Lokalisation zeigte. Dieser Zusammenhang sollte bestenfalls an weiteren Lymphom-Entitäten und größeren Patientenkollektiven

überprüft werden.

Die Arbeitsgruppe um Deutsch et al. (2012) beobachtete bei Patienten mit DLBCL und MALT-Lymphomen die Expression von CXCR4 ausschließlich bei nodalem Tumorgewebe. Extranodale Manifestationen waren sowohl bei der mRNA-Bestimmung durch die RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) als auch immunhistochemisch durchweg CXCR4-negativ. Ein solcher Zusammenhang wurde bei Stollberg et al. (2016) nicht beschrieben. Auch in der vorliegenden Arbeit waren 12 der 27 extranodalen Präparate positiv für den CXCR4. Hierbei wurden allerdings verschiedene Lymphom-Entitäten untersucht, worunter sich weder MALT-Lymphome noch DLBCL befanden. Ein direkter Vergleich wird dadurch erschwert und erklärt möglicherweise die abweichenden Ergebnisse.

Unter den Proben der vorliegenden Arbeit befanden sich zudem zwei Knochenmarksbiopsien von B-Zell-Lymphomen (NOS). Beide exprimierten den SSTR1, eine davon war zusätzlich positiv für den SSTR2. Von den zwei Tumorproben aus dem Hirngewebe exprimierte jeweils eine den SSTR3 und die andere Probe den CXCR4.

Diese Studien legen nahe, dass die Rezeptorexpression in Zusammenhang mit einer bestimmten Tumorlokalisation stehen kann und möglicherweise unter verschiedenen Entitäten differiert.

6.3 Immunhistochemie der untersuchten Rezeptoren

6.3.1 Somatostatin-Rezeptoren

Unter den SST-Rezeptorsubtypen wurde der SSTR2 am häufigsten nachgewiesen (27,66 % der Fälle), gefolgt von dem SSTR3 bei 21,28 % der Proben und dem SSTR1 mit positiven immunhistochemischen Färbereaktionen bei insgesamt 8,51 % Lymphomen. Der SSTR5 war lediglich bei 4,26 % der Tumore zu finden. Der SSTR4 wurde in keinem der Lymphome exprimiert. Die Expressionsintensitäten waren bei allen Subtypen gering. Der höchste Mittelwert lag bei einem IRS-Wert von 2,17 für den SSTR2.

Bisherige Forschungen bestätigen die Expression verschiedener SST-Rezeptoren bei malignen Lymphomen (Reubi et al. 1992b, Reubi et al. 1994, Goldsmith et al. 1995).

Erst kürzlich veröffentlichten Ruuska et al. (2018) ihre Studien über die Expression der Rezeptoren SSTR2, SSTR3 und SSTR5 bei 21 neu diagnostizierten Lymphom-Patienten. Die Rezeptoren SSTR1 und SSTR4 wurden nicht untersucht. Der Nachweis erfolgte mittels

Immunhistochemie und wurde verglichen anhand der Traceraufnahme in der PET/CT mit einem ^{68}Ga -markiertem SST-Analogon (DOTANOC). Unter den Proben befanden sich verschiedene Lymphom-Subtypen (5 DLBCL, 5 HL, 4 folliculäre Lymphome, 3 kleinzellige lymphozytische Lymphome, 2 MCL, 1 MZL, 1 MALT-Lymphom). Der SSTR2 war positiv bei allen folliculären Lymphomen und einem DLBCL. Der SSTR3 wurde bei 4/5 HL nachgewiesen. Auch der SSTR5 zeigte bei einem der fünf HL-Präparate eine positive Färbereaktion in der Immunhistochemie. Bei einer HL-Probe und einem DLBCL wurde der Rezeptorstatus für den SSTR5 als unklar eingestuft. Diese Ergebnisse decken sich Großteils mit denen der vorliegenden Arbeit. Eine Ausnahme stellt die Positivität von SSTR3 bei HL-Präparaten dar, die in dieser Arbeit nicht beobachtet wurde. Allerdings liefern die Ergebnisse der PET/CT bei Ruuska et al. nicht in jedem Fall eine Übereinstimmung mit der immunhistochemischen Analyse. Begründet wurde dies unter anderem durch die Expression von SSTR-Subtypen in nicht malignen Zellen bei positiver Traceraufnahme und gleichzeitig negativer Immunhistochemie. Des Weiteren kann eine geringe Rezeptorzahl einzelner Zellen zu positiven Ergebnissen in der Immunhistochemie geführt haben und keine Traceraufnahme in der PET/CT begründen.

Die Untersuchung von zehn Lymphompatienten durch Dalm et al. (2004) auf die Expression von SST-Rezeptoren mit Hilfe einer RT-PCR, zeigte bei allen Präparaten einen positiven mRNA-Nachweis für den SSTR2. Unter den Präparaten befanden sich sechs NHL der Orbita und je zwei NHL- und HL-Präparate aus der Halsregion. Bei den NHL-Präparaten der orbitalen Region konnte zusätzlich mRNA des SSTR3 detektiert werden. Die Rezeptoren SSTR1, SSTR4 und SSTR5 waren hingegen bei allen Proben negativ. Überraschenderweise erbrachte die immunhistochemische Färbung derselben Präparate durchweg negative Ergebnisse. Begründet werden diese Befunde durch eine zu geringe Rezeptorexpression in den Geweben. Möglicherweise wurden diese Unterschiede auch durch die Wahl der Antikörper für die Immunhistochemie beeinflusst. Verwendet wurden im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit polyklonale Antikörper in einer höheren Verdünnung (1:2000 und 1:3000). Weiterhin wurden von den Präparaten dickere Schnitte angefertigt (5 μm im Vergleich zu 4 μm in der vorliegenden Arbeit), was die immunhistochemische Färbereaktion beeinflussen könnte.

Allerdings war auch in der vorliegenden Arbeit die Expressionsstärke der SSTR-Subtypen im Vergleich zu anderen SSTR-positiven Tumoren, wie z. B. dem Hypophysenadenom, eher gering und bestätigt die Vermutung von Dalm und Kollegen, dass die Lymphome nur eine geringe SST-Rezeptorzahl aufweisen.

Bei der Betrachtung von 55 MALT-Lymphomen durch Stollberg et al. (Stollberg et al. 2016) konnten hingegen alle SSTR-Subtypen mit unterschiedlichen Häufigkeiten nachgewiesen werden. Der SSTR5 kam in der Hälfte der Fälle und damit am häufigsten vor. Gefolgt von dem SSTR2 und SSTR3. Der SSTR4 konnte in 18 % und der SSTR1 nur in 2 % der Fälle nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit war eine Expression des SSTR5 ausschließlich bei den HL zu beobachten. Unter den Proben waren jedoch keine MALT-Lymphome vertreten. Auch hier lässt sich vermuten, dass die Expression der SST-Rezeptoren unter den verschiedenen Lymphom-Subtypen variiert und von der histologischen Morphologie der Entitäten abhängig ist.

Interessanterweise stellten sich die HSR-Zellen in den Präparaten der HL dieser Arbeit positiv für den SSTR2 dar. Sie wurden jedoch mit einer mittleren Färbeintensität (\cong 2 Punkten) bewertet und machten nur einen geringen Anteil von unter 5 % des gesamten Tumorgewebes aus (\cong 1 Punkt). Daher erreichten diese Präparate lediglich einen IRS-Wert von 2, der laut Klassifikation noch als Rezeptor-negativ gilt.

Auch Ruuska et al. (2018) beschrieben dieses Merkmal der HSR-Zellen. Bei 4/5 ihrer HL-Proben fanden sie eine positive immunhistochemische Färbereaktion für den SSTR2. Jedoch konnte die Rezeptor-Expression im PET/CT nur bei der Hälfte dieser HL bestätigt werden. Möglicherweise liegt das an der geringen Anzahl der HSR-Zellen im Tumor und dadurch nur wenigen Rezeptoren im Gewebe. Außerdem haben Ruuska und Kollegen die immunhistochemische Auswertung ohne ein Scoring-System beurteilt, sondern nur danach, ob sich maligne Zellen in den Tumorerläsionen anfärbten. Dieses Vorgehen kann unter Umständen zu falsch-positiven Ergebnissen geführt haben.

Wie bereits erwähnt waren die beiden HL-Präparate von Dalm et al. (2004) negativ für den SSTR2, wobei der Nachweis mittels RT-PCT und nicht durch eine immunhistochemische Färbung erfolgte. Das könnte das negative Ergebnis erklären, da die HSR-Zellen nicht separat betrachtet werden konnten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die meisten Autoren übereinstimmend den SSTR2 als SST-Rezeptorsubtypen bei den NHL fanden. Allerdings liegen meistens nur kleine Fallzahlen vor, wodurch insgesamt wenige Daten für die einzelnen Lymphom-Entitäten existieren. Auch ist die Nachweismethode der Rezeptoren in den verschiedenen Studien nicht einheitlich (Immunhistochemie mittels unterschiedlicher Antikörper, mRNA-Nachweis durch RT-PCR, PET/CT mit verschiedenen Tracern), was den Vergleich der Ergebnisse limitiert.

Die Kenntnis über die Expression der SSTR in Neoplasien kann auch eine Bedeutung für andere Erkrankungen beigemessen werden. Es wurde bereits über falsch-positive Diagnosen von NET in der PET/CT mit SST-Analoga berichtet, die sich histologisch letztendlich als NHL herausstellten (Yamaga et al. 2017, Ruuska et al. 2018). Dies verdeutlicht die Notwendigkeit der weiteren Forschung bezüglich der Expression von SST-Rezeptorsubtypen in unterschiedlichen malignen Geweben und peritumoralen Bereichen.

6.3.2 Rezeptor CXCR4

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der Präparate ergab bei 48,94 % der Fälle eine positive Reaktion für den CXCR4. Damit war er weitaus häufiger nachweisbar als die SST-Rezeptorsubtypen. Auch weist der CXCR4 die höchste Expressionsintensität unter allen untersuchten Rezeptoren dieser Arbeit auf.

Verschiedene Forscher beschäftigten sich bereits mit der Expression des Rezeptors CXCR4 bei diversen Lymphom-Subtypen. Nachgewiesen wurde er unter anderem bei Burkitt Lymphomen (Beider et al. 2013), folliculären Lymphomen (Pandey et al. 2017), Mantelzelllymphomen (Kurtova et al. 2009), DLBCL und der B-CLL (Mohle et al. 1999, Barretina et al. 2003). In diesen Studien wurden andere Nachweismethoden als in der vorliegenden Arbeit verwendet, wie zum Beispiel die Detektion von mRNA durch die RT-PCR und Durchflusszytometrie-Analysen mit fluoreszierenden Antikörpern.

Vergleichbare Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen fanden sich an MALT-Lymphomen durch Stollberg et al. (2016). Der CXCR4 konnte in fast allen Präparaten nachgewiesen werden (92 % der Fälle). Im Gegensatz dazu wurde durch Deutsch et al. (2012) veröffentlicht, dass es bei MALT-Lymphomen zu einem Verlust des CXCR4 mit einer vermehrten Expression des CXCR7 kommt, wodurch eine Progression zu einem extranodalen DLBCL bedingt sein könnte. Dies ist möglicherweise ein spezifisches Phänomen von MALT-Lymphomen des Magens und muss aufgrund der breiten Diversität der Lymphome nicht auf andere Entitäten zutreffen. So beobachteten Smith et al. (2007) bei zehn Präparaten von Patienten mit einem DLBCL des Zentralnervensystems eine starke CXCR4-Expression in der immunhistochemischen Färbung mit einem monoklonalen Antikörper. Bei der immunhistochemischen Auswertung von drei okulären DLBCL exprimierten ausschließlich die malignen B-Zellen den CXCR4 (Chan et al. 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die bisherige Erkenntnis, dass Lymphome

typischerweise CXCR4 exprimieren, was sie in Zukunft für spezifische Diagnose- und Therapieansätze zugänglich machen kann.

Bereits durch Leisser et al. (2017) wurde die Verwendung von ^{68}Ga -Pentixafor für eine nicht-invasive Diagnostik bei NHL vorgeschlagen. In Tierversuchen an Mäusen konnte eine Reduktion der Tumorprogression und von Metastasen bei NHL durch anti-CXCR4-Antikörper gezeigt werden (Bertolini et al. 2002). Entsprechende anti-CXCR4 Antikörper (Ulocuplumab) für den Einsatz bei akuter myeloischer Leukämie, NHL, CLL und dem Multiplen Myelom sind derzeit im Mittelpunkt der Forschung (Kuhne et al. 2013). Dabei wurde bereits an Zellkulturen von Patienten mit B-CLL gezeigt, dass Ulocuplumab eine apoptotische Wirkung auf die malignen Zellen hat (Kashyap et al. 2016).

Zusammenfassend stellt die Behandlung von NHL-Patienten durch die Neutralisierung von CXCR4 durch monoklonale Antikörper eine in der Zukunft denkbare Methode dar. Deshalb sind weitere Untersuchungen der Expression dieses Rezeptors in malignen Neoplasien gerechtfertigt und vonnöten.

Des Weiteren sind die Zusammenhänge der Expression von CXCR4 mit klinischen Daten wie dem Grad der Erkrankung, der Prognose oder dem Rezidiv-freien Überleben von Interesse und wurden in dieser Arbeit untersucht.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Grading und der CXCR4-Expression konnte bei keiner Entität gefunden werden. Bedauerlicherweise war das Grading der drei B-CLL dieser Untersuchung nicht bekannt und konnte nicht mit in die Auswertung eingehen. Denn in anderen Studien wurde dahingehend gezeigt, dass die Expression von CXCR4 mit dem Grading bei B-CLL korreliert (Ghobrial et al. 2004). Erklärbar ist dieser Zusammenhang durch die anti-apoptotische Wirkung von CXCR4 und seinem Liganden CXCL12 bei malignen B-Zellen der B-CLL (Burger et al. 2000). Auch wurde eine Ausbildung von Pseudopodien bei CXCR4-positiven B-Zellen beobachtet, die die Bildung von Metastasen begünstigen könnte. Eine Beteiligung des CXCR4 bei der Bildung von Metastasen wurde durch Weng et al. (2003) auch bei T-Zell-Lymphomen suggeriert und könnte generell eine Rolle bei der Tumormetastasierung spielen.

Weiterhin ist durch verschiedene Studien bekannt, dass eine hohe Expression von CXCR4 mit einem schlechteren Überleben der Patienten verbunden ist. Diese Vermutung konnte bei zahlreichen Neoplasien bestätigt werden. Darunter die akute myeloische Leukämie und die chronische lymphatische Leukämie (Ishibe et al. 2002, Spoo et al. 2007), Brustkrebs (Zhang

et al. 2014), Kolorektale Karzinome (Kim et al. 2005) und kleinzellige Lungenkarzinome (Spano et al. 2004). Zum Zeitpunkt der Datenauswertung waren nur zwei der Patienten verstorben, weshalb ein möglicher Zusammenhang zwischen der Expression von CXCR4 und dem Überleben nicht aussagekräftig evaluiert werden konnte. Die Proben beider Patienten waren jedoch stark positiv für den Rezeptor CXCR4, was auf eine vermehrte Expression bei einer schlechteren Prognose hindeuten könnte.

6.3.3 Expressionsmuster der Rezeptoren

Bezüglich der Expressionsmuster zeigten die meisten Lymphome ausschließlich für den CXCR4 (29,79 % der Fälle) Positivitäten. Auch die Rezeptorsubtypen SSTR2 und SSTR3 kamen gehäuft vor, ohne dass ein weiterer Rezeptor exprimiert wurde (12,77 % und 8,51 % der Fälle). Die häufigste Rezeptorkombination bestand im Auftreten von dem SSTR3 zusammen mit dem CXCR4. Dies konnte allerdings nur bei 6,38 % der Patienten nachgewiesen werden. Weitere Expressionsmuster wurden nicht gehäuft gefunden, sondern traten nur bei vereinzelt Proben auf.

Eine signifikante Korrelation wurde mit Hilfe des Spearman-Tests für die Expression des SSTR2 und SSTR5 ermittelt. Da der SSTR5 jedoch nur bei den beiden HL-Proben positive IRS-Werte erreichte, ist dieser Zusammenhang nicht auf die NHL übertragbar und sollte bestenfalls an einer größeren Fallzahl von HL-Patienten weiter untersucht werden. In der Literatur ließen sich bisher keine Daten finden, die die Expression der verschiedenen SST-Rezeptorsubtypen in Zusammenhang mit dem CXCR4 bei HL erforschten, weshalb eine Einordnung zu diesem Zeitpunkt nicht möglich ist.

Anders als in der vorliegenden Arbeit, wurden bei der Untersuchung von MALT-Lymphomen signifikante Korrelationen zwischen der Expression des SSTR3 sowohl mit dem SSTR4 als auch mit dem SSTR5 gefunden. Zudem wurde der SSTR4 signifikant gehäuft mit dem SSTR5 exprimiert (Stollberg et al. 2016).

Reubi et al. (1994) konnten in einem ihrer zwei NHL-Präparate den SSTR1 und den SSTR3 gemeinsam nachweisen. Eine genauere Klassifikation des Lymphom-Subtyps wurde dabei nicht beschrieben. Auch wurde die Expression des SSTR4 und des SSTR5 nicht untersucht.

Bei den sechs orbitalen NHL-Präparaten von Dalm et al. (2004) konnte mRNA des SSTR2 und SSTR3 nachgewiesen werden. Wie bereits in 6.3.1 beschrieben wurde, konnte die Expression dieser Rezeptoren in der Immunhistochemie nicht bestätigt werden.

Für NET des Gastrointestinaltrakts von 164 Patienten wurde ein inverser Zusammenhang zwischen der Expression von CXCR4 und dem SSTR4 in Abhängigkeit der Malignität gezeigt (Kämmerer et al. 2015a). Mit steigendem histologischen Grad waren die Tumore vermehrt positiv für den CXCR4 und seltener positiv für den SSTR2. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit an malignen Lymphomen nicht bestätigt werden. Das Grading war allerdings nur von einer geringen Anzahl der Lymphom-Patienten bekannt.

Auch verschiedene Bronchialkarzinome wurden hinsichtlich ihrer Expression von SST-Rezeptoren und CXCR4 hin untersucht (Specht et al. 2015). Hier konnte bei 4/22 Adenokarzinomen der Lunge der CXCR4 gemeinsam mit dem SSTR1, SSTR4 und SSTR5 gefunden werden. 5/21 Plattenepithelkarzinomen der Lunge exprimierten gleichzeitig folgende Rezeptoren: CXCR4, SSTR1, SSTR2 und SSTR5. Weitere 3/14 kleinzellige Bronchialkarzinome zeigten Positivitäten für den Rezeptor CXCR4, SSTR1, SSTR2, SSTR4 und SSTR5. In dieser Studie wurde jedoch bereits ein IRS-Wert von 2 Punkten als positiv für den jeweiligen Rezeptor gewertet, was den Vergleich mit der vorliegenden Arbeit erschwert.

Weiterhin wurden bei 4/77 hepatozellulären Karzinomen die Rezeptoren SSTR5 und CXCR4 gemeinsam exprimiert. Von 27 cholangiozellulären Karzinomen waren neun Proben positiv für die Rezeptoren SSTR1 und CXCR4 (Kämmerer et al. 2017).

Beim Betrachten der Datenlage wird ersichtlich, dass sich die verschiedenen Neoplasien in ihrer Expression der Rezeptoren wesentlich unterscheiden. Aufgrund der hohen Diversität der Lymphom-Entitäten ist es daher sinnvoll, weitere Untersuchungen an einzelnen Subtypen durchzuführen, um eine bessere Vergleichbarkeit zu ermöglichen. Schon Ferone et al. (2001) sahen eine vielversprechende Perspektive in der Ermittlung distinkter Expressionsmuster der SST-Rezeptorsubtypen bei lymphoproliferativen Erkrankungen. Dadurch würde die Behandlung mit selektiven Analoga und/oder die Strahlentherapie durch eine PRRT ermöglicht.

6.4 Intraindividuelle Standardabweichung

Von 20 der Patienten lag mehr als ein Tumorblock vor, weshalb die intraindividuelle Standardabweichung der immunhistochemischen Ergebnisse ermittelt wurde. Damit sollte die Schwankungsbreite innerhalb eines Tumors besser dargestellt werden. Der Rezeptorsubtyp SSTR2 zeigte hierbei die größte Expressionsschwankung ($SD_{\text{Max}} = 5,00$). Gefolgt von dem SSTR3 und dem CXCR4 mit geringeren Standardabweichungen ($SD_{\text{Max}} = 3,00$ und $2,70$). Die restlichen Rezeptoren wiesen nur leichte Schwankungen auf. Sie waren allerdings auch nur in sehr wenigen Tumoren exprimiert.

Es ist bereits bekannt, dass die Expression der SST-Rezeptorsubtypen innerhalb eines Tumors und bei verschiedenen Patienten stark variieren kann (Volante et al. 2007, Kämmerer et al. 2014). Bei der Untersuchung von bronchopulmonalen NET auf die Expression von SST-Rezeptoren fanden sich die größten Standardabweichungen verschiedener Tumorblöcke ebenfalls für den SSTR2 (Specht 2013). Bei der Auswertung des Rezeptorstatus sollte demnach berücksichtigt werden, dass bei einzelnen Proben und in bestimmten Tumorbereichen auch negative Ergebnisse entstehen können, obwohl dieser Rezeptor eventuell in anderen Bereichen exprimiert wird.

In dieser Arbeit lag die größte Abweichung des Ki-67-Indexes verschiedener Blöcken eines Tumors bei 14,05 %. Außerdem gab es innerhalb desselben Präparates teilweise Tumorbereiche mit sehr vielen teilungsaktiven Zellen, während andere Bereiche einen niedrigeren Anteil Ki-67-positiver Zellkerne aufwiesen. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da nicht alle Tumorbereiche gleichermaßen wachsen können und es besonders innerhalb von Proliferationsfronten und am Rand der Tumore zu einer hohen Zellteilungsrate kommt.

Anzumerken ist auch die starke Abhängigkeit der manuellen Auszählung der Zellen von dem Untersucher. Gerade im mittleren Bereich des Ki-67-Indexes ist eine hohe Variabilität möglich. Varga et al. (2012) verglichen die Zählungen Ki-67-positiver Zellkerne von Grad 2 Brustkrebs-Proben durch fünf unterschiedliche Pathologen. Hierbei kam es zu großen Abweichungen mit bestenfalls schlechter bis mäßiger Übereinstimmung der Ergebnisse (Cohen Kappa $\kappa = 0,17-0,49$). Beispielsweise wurde ein Präparat mit einem Ki-67-Index von 10 % bewertet, während ein anderer Pathologe dasselbe Präparat bei einem Wert von 35 % einstuft. Beeinflusst wird das Ergebnis der Zählung auch durch die Auswahl des Tumorbereichs, in dem die Tumorzellen gezählt werden und durch das Beurteilen darüber, welche Zellkerne positiv sind und welche nicht (Varga et al. 2012).

6.5 Ki-67-Index

Ki-67-Index und Lymphom-Entitäten

In der vorliegenden Arbeit wurde der Anteil Ki-67-positiver Zellkerne bei 45 Non-Hodgkin-Lymphomen und zwei Hodgkin-Lymphomen bestimmt. Dabei fanden sich sehr unterschiedliche Ergebnisse. Bei den NHL lag die Spannweite der Ki-67-Werte zwischen 1,19 % bis maximal 77,85 % positiver Zellkerne. Bei der Errechnung des Mittelwertes ergab sich ein durchschnittlicher Ki-67-Index von 24,69 %. Die Patienten mit einem HL erreichten einen Proliferationsindex von 14,28 % und 21,28 %.

Es konnten keine signifikanten Korrelationen bezüglich der Entitäten sowohl zwischen den HL und NHL, als auch zwischen den verschiedenen NHL-Entitäten ermittelt werden, weshalb eine Einordnung der Daten in diesem Fall nicht möglich ist. Denkbar ist ein zu geringer Anteil an klassifizierten Subtypen, der den Vergleich untereinander erschwert.

Die Ergebnisse anderer Forschungen zeigten im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Lymphom-Entitäten. Die Betrachtung von 319 Patienten mit NHL durch Brayde et al. (2009) brachte die höchsten Ki-67-Werte für die DLBCL mit einem Mittelwert von 67,5 % Ki-67-positiver Zellkerne, während indolente Lymphome wie die MALT Lymphome und die lymphoplasmozytischen Lymphome wesentlich geringere Werte ergaben (Ki-67-Index: 13,2 % und 12,5 %).

Bezüglich der nodalen und extranodalen Tumorlokalisation der Proben konnte in dieser Arbeit keine signifikante Korrelation mit dem Proliferationsindex festgestellt werden. Bestätigt werden diese Beobachtungen durch die Ergebnisse von Hashmi et al. (2014), die 215 maligne Lymphome verschiedener Patienten mit HL und NHL auf die Expression von Ki-67 hin untersuchten und ebenfalls keinen Zusammenhang unter diesem Aspekt fanden. Zu dem selben Ergebnis kamen Payandeh et al. (2015). Sie beschrieben zwar höhere Werte für extranodal befallene Tumorgewebe, allerdings konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden ($p = 0,360$).

Diese Studienlage lässt die Schlussfolgerung zu, dass das Ausmaß der Proliferation nicht von der Lokalisation abhängig ist, sondern vielmehr von dem spezifischen Lymphom-Subtyp und davon, ob dieser typischerweise ein aggressives Wachstum zeigt oder nicht.

Ki-67-Index und Rezeptorsubtypen

In dieser Arbeit wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem Ki-67-Index und den untersuchten Rezeptoren lediglich für den SSTR4 gefunden ($p = 0,045$). Allerdings waren

keine der ermittelten IRS-Werte größer als zwei. Somit lagen die Werte durchgängig im Rezeptor-negativen Bereich. Der SSTR4 kann aus diesem Grund trotz Signifikanz nicht mit dem Proliferationsindex in Verbindung gebracht werden.

Anders als in der vorliegenden Arbeit, konnte für die MALT-Lymphome bereits ein Zusammenhang zwischen der Expression von CXCR4 und dem Protein Ki-67 nachgewiesen werden (Stollberg et al. 2016). Präparate mit höheren IRS-Werten für diesen Rezeptor hatten auch einen höheren Proliferationsindex. Für die SST-Rezeptorsubtypen konnte ein solcher Zusammenhang für die MALT-Lymphome nicht gefunden.

Für weitere Lymphom-Entitäten ergab die Recherche keine Daten für einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von SST-Rezeptorsubtypen bzw. dem CXCR4 und der Expression des Proteins Ki-67. Es liegen jedoch Daten zu anderen Neoplasien vor. Beispielsweise wurde durch die Arbeitsgruppe um Qiu et al. (2006) bei Kolorektalen Karzinomen ein inverser Zusammenhang zwischen der Expression von SSTR2 und SSTR3 mit dem Ki-67-Index beschrieben. Auch andere Arbeiten kamen zu diesem Ergebnis (Riedel 2013, Hennigs et al. 2014).

Beim Betrachten der Signalwege, die durch die SSTR-Subtypen ausgelöst werden, liegt es nahe, dass die vermehrte Expression des SSTR2 und des SSTR3 die Mitoserate der Zellen vermindert. Sie aktivieren über G-Proteine unter anderem die MAP-Signalkaskade und hemmen darüber die Zellproliferation (siehe 2.2.2).

Das erklärt auch die verbesserten Therapieresultate durch SST-Analoga, wie sie für NET gezeigt wurden (Faggiano et al. 2016). Bereits ein Ki-67-Index von 5 % führte zu einem verbesserten Ansprechen auf SST-Analoga, als NET mit einem Ki-67-Index von 3 %. Eine Untersuchung der Expression der SSTR-Subtypen wurde in dieser Arbeit allerdings nicht vorgenommen.

Ki-67-Index und Grading/Überleben

Sowohl für das Grading als auch für das Überleben der Patienten konnte in dieser Arbeit ein signifikanter Zusammenhang mit dem Ki-67-Proliferationsindex festgestellt werden. Ein hoher Anteil Ki-67-positiver Zellkerne korrelierte mit einem höheren Grading nach Ann Arbor ($\tau_b = 0,669$; $p = 0,019$) und einem schlechteren Überleben ($r_{sp} = 0,319$; $p = 0,029$).

In der Literatur lassen sich diese Ergebnisse bestätigen. Der erste Vorschlag, den Ki-56-Indexes als Prognoseparameter bei Non-Hodgkin-Lymphomen einzusetzen, wurde durch Gerdes et al. (1984) suggeriert. Seitdem folgten zahlreiche Studien, die den Nutzen dieses

Markers an verschiedenen Neoplasien erforschten. Die am besten untersuchten Beispiele im Zusammenhang mit dem Protein Ki-67 sind Karzinome der Prostata und der Brust. Für diese Tumortypen wurde der prognostische Wert für das Überleben wiederholt nachgewiesen (Scholzen und Gerdes 2000). Aber auch für die spezifischen Entitäten der malignen Lymphome liegen Untersuchungen vor, die einen direkten Zusammenhang zwischen dem Ki-67-Index und dem Grading bzw. Überleben gefunden haben. Solche Arbeiten existieren beispielsweise für Mantelzelllymphome (Haige et al. 2017), folliculäre Lymphome (Sylvia et al. 2016) und das DLBCL (Li et al. 2011).

Aggressive NHL-Entitäten zeigten im Schnitt eine höhere Expression von Ki-67, während indolente und weniger aggressive Lymphome mit einer geringeren Expression einhergehen. So wurde durch die Arbeitsgruppe um Li et al (2011) bei der Betrachtung von 542 DLBCL ein Cut-off-Wert von 50 % als Abgrenzung indolenter zu aggressiven DLBCL gefunden sowie ein Ki-67-Wert von über 75 % mit einer schlechteren Prognose in Zusammenhang gestellt.

Hashmi et al (2014) verglichen die Ki-67-Indizes bei 215 Patienten mit NHL und fanden im Durchschnitt geringere Werte bei indolenten Lymphomen, wie dem Mantelzelllymphom (Ki-67-Index: 25 %), dem Marginalzonenlymphom (Ki-67-Index: 28,5 %) und dem folliculären Lymphom (Ki-67-Index: 34,6 %). Aggressive Lymphom-Entitäten erreichten wesentlich höhere Werte (T-Zell-Lymphome: 66,9 %; lymphoblastische Lymphome: 83,3 %; Burkitt-Lymphome: 94,4 %). Eine Korrelation zwischen dem Ki-67-Index und anderen klinischen Gesichtspunkten konnte nicht festgestellt werden.

Eine umfangreiche Metaanalyse mit 27 Studien (3902 Lymphom-Patienten) bestätigte den inversen Zusammenhang zwischen einem hohen Anteil Ki-67-positiver Zellkerne mit einem schlechteren Überleben und erkrankungsfreiem Zeitraum für NHL (He et al. 2014). Für andere klinische Parameter und ebenso für Hodgkin-Lymphome konnte in dieser Analyse keine Korrelation mit dem Ki-67-Index gefunden werden.

Zu einem anderen Ergebnis kamen Morente et al (1997). Sie ermittelten für die HL einen Cut-off-Wert des Proliferationsindex bei 50 % als signifikant unabhängigen Prognosefaktor. Ljubomir et al. (2007) fanden bei ihrer Studie mit 210 HL-Patienten bereits bei einem Cut-off-Wert von 20 % eine Korrelation zwischen einem hohen Ki-67-positiven Prozentsatz mit einer kürzeren Überlebenszeit (p-Wert: 0,0206).

Da von beiden HL-Patienten keine klinischen Daten zum Grading vorlagen und sie zum Untersuchungszeitpunkt noch am Leben waren, kann in dieser Arbeit keine Aussage über den Zusammenhang zwischen Ki-67-Wert und Überleben bzw. Grading getroffen werden.

7 Literaturverzeichnis

- Ansell SM. 2015. Hodgkin Lymphoma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*, 90 (11):1574-1583.
- Arnaldi G, Boscaro M. 2010. Pasireotide for the treatment of Cushing's disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 19 (7):889-898.
- Azab AK, Runnels JM, Pitsillides C, Moreau AS, Azab F, Leleu X, Jia X, Wright R, Ospina B, Carlson AL, Alt C, Burwick N, Roccaro AM, Ngo HT, Farag M, Melhem MR, Sacco A, Munshi NC, Hideshima T, Rollins BJ, Anderson KC, Kung AL, Lin CP, Ghobrial IM. 2009. CXCR4 inhibitor AMD3100 disrupts the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment and enhances their sensitivity to therapy. *Blood*, 113 (18):4341-4351.
- Balkwill F. 2004a. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*, 4 (7):540-550.
- Balkwill F. 2004b. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol*, 14 (3):171-179.
- Barretina J, Junca J, Llano A, Gutierrez A, Flores A, Blanco J, Clotet B, Este JA. 2003. CXCR4 and SDF-1 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and stage of the disease. *Ann Hematol*, 82 (8):500-505.
- Beider K, Ribakovskiy E, Abraham M, Wald H, Weiss L, Rosenberg E, Galun E, Avigdor A, Eizenberg O, Peled A, Nagler A. 2013. Targeting the CD20 and CXCR4 Pathways in Non-Hodgkin Lymphoma with Rituximab and High-Affinity CXCR4 Antagonist BKT140. *Clinical Cancer Research*, 19 (13):3495-3507.
- Bertolini F, Dell'Agnola C, Mancuso P, Rabascio C, Burlini A, Monestiroli S, Gobbi A, Pruneri G, Martinelli G. 2002. CXCR4 neutralization, a novel therapeutic approach for non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Res*, 62 (11):3106-3112.
- Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbes S, Gremy F. 1981. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48 (1):198-206.
- Böcker W, Denk H, Heitz U. 2012. Pathologie. Fünfte völlig überarbeitete Aufl. München: Urban & Fischer Verlag, 446-457.
- Bousquet C, Puente E, Buscail L, Vaysse N, Susini C. 2001. Antiproliferative Effect of Somatostatin and Analogs. *Chemotherapy*, 47(suppl 2) (Suppl. 2):30-39.
- Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science (New York, N Y)*, 179 (4068):77-79.
- Broyde A, Boycov O, Strenov Y, Okon E, Shpilberg O, Bairey O. 2009. Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma.
- Bruns C, Lewis I, Briner U, Meno-Tetang G, Weckbecker G. 2002. SOM230: a novel somatostatin peptidomimetic with broad somatotropin release inhibiting factor (SRIF) receptor binding and a unique antisecretory profile. *Eur J Endocrinol*, 146 (5):707-716.
- Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. 2000. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*, 96 (8):2655-2663.
- Byrne GE, Jr. 1977. Rappaport classification of non-Hodgkin's lymphoma: histologic features and clinical significance. *Cancer treatment reports*, 61 (6):935-944.

- Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. 2011. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117 (19):5019-5032.
- Cashen A, Lopez S, Gao F, Calandra G, MacFarland R, Badel K, DiPersio J. 2008. A phase II study of plerixafor (AMD3100) plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization in patients with Hodgkin lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant*, 14 (11):1253-1261.
- Chan CC, Shen D, Hackett JJ, Buggage RR, Tuailon N. 2003. Expression of chemokine receptors, CXCR4 and CXCR5, and chemokines, BLC and SDF-1, in the eyes of patients with primary intraocular lymphoma. *Ophthalmology*, 110 (2):421-426.
- Chen J, Xu-Monette ZY, Deng L, Shen Q, Manyam GC, Martinez-Lopez A, Zhang L, Montes-Moreno S, Visco C, Tzankov A, Yin L, Dybkaer K, Chiu A, Orazi A, Zu Y, Bhagat G, Richards KL, Hsi ED, Choi WW, van Krieken JH, Huh J, Ponzoni M, Ferreri AJ, Zhao X, Moller MB, Farnen JP, Winter JN, Piris MA, Pham L, Young KH. 2015. Dysregulated CXCR4 expression promotes lymphoma cell survival and independently predicts disease progression in germinal center B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*, 6 (8):5597-5614.
- Chensue SW. 2001. Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. *Clin Microbiol Rev*, 14 (4):821-835, table of contents.
- Chiu BCH, Weisenburger DD. 2003. An Update of the Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Clinical Lymphoma*, 4 (3):161-168.
- Dalm VA, Hofland LJ, Mooy CM, Waaijers MA, van Koetsveld PM, Langerak AW, Staal FT, van der Lely AJ, Lamberts SW, van Hagen MP. 2004. Somatostatin receptors in malignant lymphomas: targets for radiotherapy? *J Nucl Med*, 45 (1):8-16.
- de Jong M, Breeman WA, Valkema R, Bernard BF, Krenning EP. 2005. Combination radionuclide therapy using ¹⁷⁷Lu- and ⁹⁰Y-labeled somatostatin analogs. *J Nucl Med*, 46 Suppl 1:13s-17s.
- Demmer O, Gourni E, Schumacher U, Kessler H, Wester HJ. 2011. PET imaging of CXCR4 receptors in cancer by a new optimized ligand. *ChemMedChem*, 6 (10):1789-1791.
- Deutsch AJA, Steinbauer E, Hofmann NA, Strunk D, Gerlza T, Beham-Schmid C, Schaidler H, Neumeister P. 2012. Chemokine receptors in gastric MALT lymphoma: loss of CXCR4 and upregulation of CXCR7 is associated with progression to diffuse large B-cell lymphoma. *Modern Pathology*, 26:182.
- Dorfman RF. 1974. Letter: Classification of non-Hodgkin's lymphomas. *Lancet (London, England)*, 1 (7869):1295-1296.
- Dreyling M, Buske C, Drach J, Herold M Zugriff: 31.10.2016. Mantelzell-Lymphom <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mantelzell-lymphom/@@view/html/index.html>.
- Dürkop H, Foss H-D, Stein H. 2011. The 2008 WHO classification of malignant lymphomas in 2011. *Der Onkologe*, 17 (9):769.
- Engert A, Franklin J, Eich HT, Brillant C, Sehlen S, Cartoni C, Herrmann R, Pfreundschuh M, Sieber M, Tesch H, Franke A, Koch P, de Wit M, Paulus U, Hasenclever D, Loeffler M, Muller RP, Muller-Hermelink HK, Duhmke E, Diehl V. 2007. Two cycles of doxorubicin, bleomycin, vinblastine, and dacarbazine plus extended-field radiotherapy is superior to radiotherapy alone in early favorable Hodgkin's lymphoma: final results of the GHSG HD7 trial. *J Clin Oncol*, 25 (23):3495-3502.
- Engert A, Plutschow A, Eich HT, Lohri A, Dorken B, Borchmann P, Berger B, Greil R, Willborn KC, Wilhelm M, Debus J, Eble MJ, Sokler M, Ho A, Rank A, Ganser A, Trumper L, Bokemeyer C, Kirchner H, Schubert J, Kral Z, Fuchs M, Muller-Hermelink HK, Muller RP, Diehl V. 2010. Reduced treatment intensity in patients with early-stage Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*, 363 (7):640-652.

- Engert A, Haverkamp H, Kobe C, Markova J, Renner C, Ho A, Zijlstra J, Kral Z, Fuchs M, Hallek M, Kanz L, Dohner H, Dorken B, Engel N, Topp M, Klutmann S, Amthauer H, Bockisch A, Kluge R, Kratochwil C, Schober O, Greil R, Andreesen R, Kneba M, Pfreundschuh M, Stein H, Eich HT, Muller RP, Dietlein M, Borchmann P, Diehl V. 2012. Reduced-intensity chemotherapy and PET-guided radiotherapy in patients with advanced stage Hodgkin's lymphoma (HD15 trial): a randomised, open-label, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet*, 379 (9828):1791-1799.
- Faggiano A, Carratù AC, Guadagno E, Tafuto S, Tatangelo F, Riccardi F, Mocerino C, Palmieri G, Damiano V, Siciliano R, Leo S, Mauro A, Tozzi LF, Battista C, De Rosa G, Colao A. 2016. Somatostatin Analogues according to Ki67 index in neuroendocrine tumours: an observational retrospective-prospective analysis from real life. *Oncotarget*, 7 (5):5538-5547.
- Feller AC, Diebold J, Tourneau AL. 2011. *Histopathology of Nodal and Extranodal Non-Hodgkin's Lymphomas*. Springer Berlin Heidelberg.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. 1996. HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272 (5263):872-877.
- Ferone D, Hofland L, Colao A, W. J. Lamberts S, M van Hagen P. 2001. Neuroendocrine aspects of immunolymphoproliferative diseases.
- Fischer M, Grünwald F, Knapp WH, Trümper L, von Schilling C, Dreyling M. 2009. Leitlinie für die Radioimmuntherapie des CD20-positiven folliculären B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphoms. *Nuklearmedizin*, 48 (6):215-220.
- Fischer T, Doll C, Jacobs S, Kolodziej A, Stumm R, Schulz S. 2008. Reassessment of sst2 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-1. *J Clin Endocrinol Metab*, 93 (11):4519-4524.
- Furusato B, Mohamed A, Uhlen M, Rhim JS. 2010. CXCR4 and cancer. *Pathology international*, 60 (7):497-505.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. 1983. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*, 31 (1):13-20.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*, 133 (4):1710-1715.
- Ghobrial IM, Bone ND, Stenson MJ, Novak A, Hedin KE, Kay NE, Ansell SM. 2004. Expression of the chemokine receptors CXCR4 and CCR7 and disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia/ small lymphocytic lymphoma. *Mayo Clin Proc*, 79 (3):318-325.
- Glaser SL, Clarke CA, Keegan THM, Chang ET, Weisenburger DD. 2015. Time trends in rates of Hodgkin lymphoma histologic subtypes: true incidence changes or evolving diagnostic practice? *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 24 (10):1474-1488.
- Goldsmith SJ, Macapinlac HA, O'Brien JP. 1995. Somatostatin-Receptor imaging in lymphoma. *Seminars in Nuclear Medicine*, 25 (3):262-271.
- Goodman RH, Aron DC, Roos BA. 1983. Rat pre-prosomatostatin. Structure and processing by microsomal membranes. *J Biol Chem*, 258 (9):5570-5573.
- Gräfe KH, Lutz W, Bönisch H. 2016. *Zielgerichtete Tumortheraeutika. Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Thieme, 675 - 683.
- Grufferman S, Cole P, Smith P, Lukes R. 1977. Hodgkin's disease in siblings. *N Engl J Med*, 296:248-250.

- Guillemin R. 1978. Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron. *Science*, 202 (4366):390-402.
- Gutensohn N, Cole P. 1977. Epidemiology of Hodgkin's disease in the young. *International Journal of Cancer*, 19 (5):595-604.
- Hahn JM. 2013. Hämatologische Erkrankungen. Checkliste Innere Medizin. Stuttgart, New York: Thieme, 565 - 573.
- Haige Y, Desai A, Dongfeng Z, Nomie K, Romaguera J, Ahmed M, Wang ML. 2017. Smoldering mantle cell lymphoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* (17569966), 36:1.
- Hallek M, Bergmann M, Emmerich B. 2002. Chronische Lymphatische Leukämie. *Deutsches Ärzteblatt*, Heft 19:1294 - 1301.
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, Delsol G, De Wolf-Peeters C, Falini B, Gatter KC, et al. 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 84 (5):1361-1392.
- Hartge P, Devesa S. 1992. Quantification of the impact of known risk factors on time trends in non-Hodgkin's lymphoma incidence. *Cancer Res*, 52 (Suppl. 19):5566s - 5569s.
- Hashmi AA, Hussain ZF, Faridi N, Khurshid A. 2014. Distribution of Ki67 proliferative indices among WHO subtypes of non-Hodgkin's lymphoma: association with other clinical parameters. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15 (20):8759-8763.
- He X, Chen Z, Fu T, Jin X, Yu T, Liang Y, Zhao X, Huang L. 2014. Ki-67 is a valuable prognostic predictor of lymphoma but its utility varies in lymphoma subtypes: evidence from a systematic meta-analysis. *BMC Cancer*, 14 (1):153.
- Helbig G, Christopherson KW, 2nd, Bhat-Nakshatri P, Kumar S, Kishimoto H, Miller KD, Broxmeyer HE, Nakshatri H. 2003. NF-kappaB promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem*, 278 (24):21631-21638.
- Hennigs JK, Müller J, Adam M, Spin JM, Riedel E, Graefen M, Bokemeyer C, Sauter G, Huland H, Schlomm T, Minner S. 2014. Loss of Somatostatin Receptor Subtype 2 in Prostate Cancer Is Linked to an Aggressive Cancer Phenotype, High Tumor Cell Proliferation and Predicts Early Metastatic and Biochemical Relapse. *PLoS ONE*, 9 (7):e100469.
- Herold G. 2013. Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold, Gerd.
- Herrmann K, Schottelius M, Lapa C, Osl T, Poschenrieder A, Hänscheid H, Lückerrath K, Schreder M, Bluemel C, Knott M, Keller U, Schirbel A, Samnick S, Lassmann M, Kropf S, Buck AK, Einsele H, Wester H-J, Knop S. 2016. First-in-Human Experience of CXCR4-Directed Endoradiotherapy with 177Lu- and 90Y-Labeled Pentixather in Advanced-Stage Multiple Myeloma with Extensive Intra- and Extramedullary Disease. *Journal of Nuclear Medicine*, 57 (2):248-251.
- Hodgkin T. 1832. On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans*, 17:68-114.
- Hofland LJ, Lamberts SW. 2003. The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization and resistance. *Endocr Rev*, 24 (1):28-47.
- Hofland LJ, Liu Q, Van Koetsveld PM, Zuijderwijk J, Van Der Ham F, De Krijger RR, Schonbrunn A, Lamberts SW. 1999. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor subtypes sst1 and sst2A in human somatostatin receptor positive tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 84 (2):775-780.

- Hossfeld DK. 2002. E.S. Jaffe, N.L. Harris, H. Stein, J.W. Vardiman (eds). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *Annals of Oncology*, 13 (3):490-491.
- Howard OM, Ben-Baruch A, Oppenheim JJ. 1996. Chemokines: progress toward identifying molecular targets for therapeutic agents. *Trends Biotechnol*, 14 (2):46-51.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. 1981. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 29 (4):577-580.
- Hu Y, Gale M, Shields J, Garron C, Swistak M, Nguyen TH, Jacques G, Fogle R, Siders W, Kaplan J. 2012. Enhancement of the anti-tumor activity of therapeutic monoclonal antibodies by CXCR4 antagonists. *Leuk Lymphoma*, 53 (1):130-138.
- Ishibe N, Albitar M, Jilani IB, Goldin LR, Marti GE, Caporaso NE. 2002. CXCR4 expression is associated with survival in familial chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression is not. *Blood*, 100 (3):1100-1101.
- Jacobson O, Weiss ID. 2013. CXCR4 chemokine receptor overview: biology, pathology and applications in imaging and therapy. *Theranostics*, 3 (1):1-2.
- Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. 2008. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*, 112 (12):4384-4399.
- Jakovic L, S Mihaljevic B, D Perunicic Jovanovic M, D Bogdanovic A, Cemerikic-Martinovic V, Kravic-Stevovic T, Bumbasirevic V. 2007. The expression of Ki-67 and Bcl-2 in Hodgkin's lymphoma: correlation with the International Prognostic Score and bulky disease: a study by the Serbian Lymphoma Study Group (SLG).
- Jares P, Colomer D, Campo E. 2012. Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*, 122 (10):3416-3423.
- Juarez J, Bradstock KF, Gottlieb DJ, Bendall LJ. 2003. Effects of inhibitors of the chemokine receptor CXCR4 on acute lymphoblastic leukemia cells in vitro. *Leukemia*, 17 (7):1294-1300.
- Kämmerer D, Träger T, Hoffmeister M, Sipos B, Hommann M, Sängler J, Schulz S, Lupp A. 2015a. Inverse expression of somatostatin and CXCR4 chemokine receptors in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms of different malignancy. *Oncotarget*, 6 (29):27566-27579.
- Kämmerer D, Reimann C, Specht E, Wirtz RM, Sayeg M, Baum RP, Schulz S, Lupp A. 2015b. Differential expression and prognostic value of the chemokine receptor CXCR4 in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. *Oncotarget*, 6 (5):3346-3358.
- Kämmerer D, Schindler R, Mussbach F, Dahmen U, Altendorf-Hofmann A, Dirsch O, Sängler J, Schulz S, Lupp A. 2017. Somatostatin and CXCR4 chemokine receptor expression in hepatocellular and cholangiocellular carcinomas: tumor capillaries as promising targets. *BMC Cancer*, 17 (1):896.
- Kämmerer D, Athelougou M, Lupp A, Lenhardt I, Schulz S, Peter L, Hommann M, Prasad V, Binnig G, Baum Richard P. 2014. Somatostatin receptor immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: comparison between manual and automated evaluation. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7 (8):4971-4980.
- Kashyap MK, Kumar D, Jones H, Amaya-Chanaga CI, Choi MY, Melo-Cardenas J, Ale-Ali A, Kuhne MR, Sabbatini P, Cohen LJ, Shelat SG, Rassenti LZ, Kipps TJ, Cardarelli PM, Castro JE. 2016. Ulocuplumab (BMS-936564 / MDX1338): a fully human anti-CXCR4 antibody induces cell death in chronic lymphocytic leukemia mediated through a reactive oxygen species-dependent pathway. *Oncotarget*, 7 (3):2809-2822.

- Kim J, Takeuchi H, Lam ST, Turner RR, Wang HJ, Kuo C, Foshag L, Bilchik AJ, Hoon DS. 2005. Chemokine receptor CXCR4 expression in colorectal cancer patients increases the risk for recurrence and for poor survival. *J Clin Oncol*, 23 (12):2744-2753.
- Kim JS, Yoon DH, Park S, Yoon SS, Cho SG, Min CK, Lee JJ, Yang DH, Kwak JY, Eom HS, Kim WS, Kim H, Do YR, Moon JH, Lee J, Suh C. 2016. Prognostic factors for re-mobilization using plerixafor and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in patients with malignant lymphoma or multiple myeloma previously failing mobilization with G-CSF with or without chemotherapy: the Korean multicenter retrospective study. *Ann Hematol*, 95 (4):603-611.
- Koc EU, Ozgur T, Yerci O, Gurel S. 2013. Somatostatin receptor 1 (SSTR1) and somatostatin receptor 5 (SSTR5) expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*, 60 (127):1693-1697.
- Kuhne MR, Mulvey T, Belanger B, Chen S, Pan C, Chong C, Cao F, Niekro W, Kempe T, Henning KA, Cohen LJ, Korman AJ, Cardarelli PM. 2013. BMS-936564/MDX-1338: a fully human anti-CXCR4 antibody induces apoptosis in vitro and shows antitumor activity in vivo in hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*, 19 (2):357-366.
- Kulaksiz H, Eissele R, Rossler D, Schulz S, Holtt V, Cetin Y, Arnold R. 2002. Identification of somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3, and 5 in neuroendocrine tumours with subtype specific antibodies. *Gut*, 50 (1):52-60.
- Küppers R, Engert A, Hansmann M-L. 2012. Hodgkin lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*, 122 (10):3439-3447.
- Kurtova AV, Tamayo AT, Ford RJ, Burger JA. 2009. Mantle cell lymphoma cells express high levels of CXCR4, CXCR5, and VLA-4 (CD49d): importance for interactions with the stromal microenvironment and specific targeting. *Blood*, 113 (19):4604-4613.
- Lamberts SW, van der Lely AJ, de Herder WW, Hofland LJ. 1996. Octreotide. *N Engl J Med*, 334 (4):246-254.
- Le Y, Zhou Y, Iribarren P, Wang J. 2004. Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease. *Cell Mol Immunol*, 1 (2):95-104.
- Leisser A, Mayerhoffer M, Raderer M, Wadsak W, Mitterhauser M, Pfaff S, Kropf S, Wester H, Hacker M, Hartenbach M, Haug A. 2017. Non-invasive evaluation of CXCR4 expression of MALT lymphoma using ⁶⁸Ga-Pentixafor PET/MRI- a prospective study. *Journal of Nuclear Medicine*, 58 (supplement 1):563.
- Lennert K. 1969. Pathologisch-anatomische Klassifikation der malignen Lymphome. *Strahlentherapie Sonderbande*, 69:1-7.
- Lennert K, Stein H, Kaiserling E. 1975. Cytological and functional criteria for the classification of malignant lymphomata. *The British journal of cancer Supplement*, 2:29-43.
- Li J, Hu R, Liao AJ, Shi HY, Yan W, Liu ZG. 2011. [Ki-67 proliferative index in non-Hodgkin's lymphoma and its clinical significance]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 19 (4):935-939.
- Liang J-X, Gao W, Liang Y, Zhou X-M. 2015. Chemokine receptor CXCR4 expression and lung cancer prognosis: a meta-analysis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8 (4):5163-5174.
- Liu YL, Yu JM, Song XR, Wang XW, Xing LG, Gao BB. 2006. Regulation of the chemokine receptor CXCR4 and metastasis by hypoxia-inducible factor in non small cell lung cancer cell lines. *Cancer Biol Ther*, 5 (10):1320-1326.
- Lukes RJ, Collins RD. 1974. Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer*, 34 (4 Suppl):suppl:1488-1503.
- Lukes RJ, Butler JJ, Hicks EB. 1966a. Natural History of Hodgkins Disease as Related to Its Pathologic Picture. *Cancer*, 19 (3):317-&.

- Lukes RJ, Craver LF, Hall TC, Rappaport H, Ruben P. 1966b. Report of Nomenclature Committee. *Cancer Research*, 26 (6p1):1311.
- Mazur G, Butrym A, Kryczek I, Dlubek D, Jaskula E, Lange A, Kuliczowski K, Jelen M. 2014. Decreased expression of CXCR4 chemokine receptor in bone marrow after chemotherapy in patients with non-Hodgkin lymphomas is a good prognostic factor. *PLoS One*, 9 (5):e98194.
- Mohle R, Failenschmid C, Bautz F, Kanz L. 1999. Overexpression of the chemokine receptor CXCR4 in B cell chronic lymphocytic leukemia is associated with increased functional response to stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Leukemia*, 13 (12):1954-1959.
- Monti S, Savage KJ, Kutok JL, Feuerhake F, Kurtin P, Mihm M, Wu B, Pasqualucci L, Neuberg D, Aguiar RCT, Cin PD, Ladd C, Pinkus GS, Salles G, Harris NL, Dalla-Favera R, Habermann TM, Aster JC, Golub TR, Shipp MA. 2005. Molecular profiling of diffuse large B-cell lymphoma identifies robust subtypes including one characterized by host inflammatory response. *Blood*, 105 (5):1851-1861.
- Morente MM, Piris MA, Abaira V, Acevedo A, Aguilera B, Bellas C, Fraga M, Garcia-Del-Moral R, Gomez-Marcos F, Menarguez J, Oliva H, Sanchez-Beato M, Montalban C. 1997. Adverse Clinical Outcome in Hodgkin's Disease Is Associated With Loss of Retinoblastoma Protein Expression, High Ki67 Proliferation Index, and Absence of Epstein-Barr Virus-Latent Membrane Protein 1 Expression. *Blood*, 90 (6):2429-2436.
- Mueller N, Grufferman S. 1999. The Epidemiology of Hodgkin's disease. In: Mauch P, Armitage J, Diehl V, Hoppe R, Weiss L, Hrsg. *Hodgkin's disease*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 61 - 77.
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, Zlotnik A. 2001. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410 (6824):50-56.
- Mundschenk J, Unger N, Schulz S, Hollt V, Schulz S, Steinke R, Lehnert H. 2003. Somatostatin receptor subtypes in human pheochromocytoma: subcellular expression pattern and functional relevance for octreotide scintigraphy. *J Clin Endocrinol Metab*, 88 (11):5150-5157.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 52 (1):145-176.
- Na IK, Scheibenbogen C, Adam C, Stroux A, Ghadjar P, Thiel E, Keilholz U, Coupland SE. 2008. Nuclear expression of CXCR4 in tumor cells of non-small cell lung cancer is correlated with lymph node metastasis. *Hum Pathol*, 39 (12):1751-1755.
- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. 1996. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*, 382 (6592):635-638.
- Offermanns S, Rosenthal W. 2004. Somatostatin. *Encyclopedic Reference of Molecular Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 876-883.
- Ott G, Ziepert M, Klapper W, Horn H, Szczepanowski M, Bernd H-W, Thorns C, Feller AC, Lenze D, Hummel M, Stein H, Müller-Hermelink H-K, Frank M, Hansmann M-L, Barth TFE, Möller P, Cogliatti S, Pfreundschuh M, Schmitz N, Trümper L, Loeffler M, Rosenwald A. 2010. Immunoblastic morphology but not the immunohistochemical GCB/nonGCB classifier predicts outcome in diffuse large B-cell lymphoma in the RICOVER-60 trial of the DSHNHL. *Blood*, 116 (23):4916-4925.
- Pandey S, Mourcin F, Marchand T, Nayar S, Guirriec M, Pangault C, Monvoisin C, Ame-Thomas P, Guilloton F, Dulong J, Coles M, Fest T, Mottok A, Barone F, Tarte K.

2017. IL-4/CXCL12 loop is a key regulator of lymphoid stroma function in follicular lymphoma. *Blood*, 129 (18):2507-2518.
- Patel YC. 1999. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*, 20 (3):157-198.
- Patel YC, Srikant CB. 1997. Somatostatin receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 8 (10):398-405.
- Patel YC, Greenwood MT, Warszynska A, Panetta R, Srikant CB. 1994. All Five Cloned Human Somatostatin Receptors (hSSTR1-5) Are Functionally Coupled to Adenylyl Cyclase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 198 (2):605-612.
- Pawlikowski M, Meleń-Mucha G. 2004. Somatostatin analogs — from new molecules to new applications. *Current Opinion in Pharmacology*, 4 (6):608-613.
- Payandeh M, Sadeghi M, Sadeghi E. 2015. The Ki-67 index in non-Hodgkin's Lymphoma: Role and Prognostic Significance. *American Journal of Cancer Prevention*, 3 (5):100-102.
- Petit I, Jin D, Rafii S. 2007. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. *Trends Immunol*, 28 (7):299-307.
- Plöckinger U, Wiedenmann B. 2007. Treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Virchows Arch*, 451 Suppl 1:S71-80.
- Prasad V, Fetscher S, Baum RP. 2007. Changing role of somatostatin receptor targeted drugs in NET: Nuclear Medicine's view. *J Pharm Pharm Sci*, 10 (2):321s-337s.
- Project TN-HsLPC. 1982. National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. *Cancer*, 49 (10):2112-2135.
- Qiu CZ, Wang C, Huang ZX, Zhu SZ, Wu YY, Qiu JL. 2006. Relationship between somatostatin receptor subtype expression and clinicopathology, Ki-67, Bcl-2 and p53 in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 12 (13):2011-2015.
- Rappaport H. 1966. Tumors of the hematopoietic system. *Atlas of Tumor Pathology. Armed Forces Inst Path*, 97 - 161.
- Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. 2006. The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia*, 20 (11):1915-1924.
- Reinholdt L, Laursen MB, Schmitz A, Bødker JS, Jakobsen LH, Bøgsted M, Johnsen HE, Dybkær K. 2016. The CXCR4 antagonist plerixafor enhances the effect of rituximab in diffuse large B-cell lymphoma cell lines. *Biomarker Research*, 4:12.
- Reisine T. 1995. Somatostatin. *Cellular and molecular neurobiology*, 15 (6):597-614.
- Reisine T, Bell GI. 1995. Molecular properties of somatostatin receptors. *Neuroscience*, 67 (4):777-790.
- Remmele W, Stegner H. 1987. Vorschlag zur einheitlichen Definition eines Immunreaktiven Score (IRS) für den immunhistochemischen Östrogenrezeptor-Nachweis (ER-ICA) im Mammakarzinomgewebe. *Der Pathologe*, 8:138-140.
- Reubi JC, Laissue J, Krenning E, Lamberts SW. 1992a. Somatostatin receptors in human cancer: incidence, characteristics, functional correlates and clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 43 (1-3):27-35.
- Reubi JC, Schaer JC, Waser B, Mengod G. 1994. Expression and localization of somatostatin receptor SSTR1, SSTR2, and SSTR3 messenger RNAs in primary human tumors using in situ hybridization. *Cancer Res*, 54 (13):3455-3459.
- Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. 2001. Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med*, 28 (7):836-846.
- Reubi JC, Kappeler A, Waser B, Laissue J, Hipkin RW, Schonbrunn A. 1998. Immunohistochemical localization of somatostatin receptors sst2A in human tumors. *American Journal of Pathology*, 153 (1):233-245.

- Reubi JC, Waser B, van Hagen M, W. J. Lamberts S, Krenning E, Gebbers J-O, Laissue J. 1992b. In vitro and in vivo detection of somatostatin receptors in human malignant lymphomas.
- Riedel E. 2013. Bedeutung der Somatostatin-Rezeptoren Typ 2 (SSTR2) für die Prognose des Prostatakarzinoms.
- Rink L, Kruse A, Haase H. 2012. Immunologie für Einsteiger. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag:124 - 127.
- Robert-Koch-Institut 2015-05-16. Zentrum für Krebsregisterdaten <http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_node.html> (Stand: 13.12.2013) (Zugriff: 16.05.2015)
- Robert-Koch-Institut. 2013b. Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe:112 - 120.
- Rosenberg SA. 1966. Report of the committee on the staging of Hodgkin's disease. *Cancer Res*, 26:1310.
- Ruuska T, Ramírez Escalante Y, Vaittinen S, Gardberg M, Kiviniemi A, Marjamäki P, Kempainen J, Jyrkkiö S, Minn H. 2018. Somatostatin receptor expression in lymphomas: a source of false diagnosis of neuroendocrine tumor at 68Ga-DOTANOC PET/CT imaging. *Acta Oncologica*, 57 (2):283-289.
- Sasse S, Engert A. 2013. Hodgkin lymphoma. In: Marcus R, Sweetenham JW, Williams ME, Hrsg. *Lymphoma: Pathology, Diagnosis, and Treatment*. Cambridge: Cambridge University Press, 61-86.
- Scholzen T, Gerdes J. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*, 182 (3):311-322.
- Schottelius M, Osl T, Poschenrieder A, Hoffmann F, Beykan S, Hanscheid H, Schirbel A, Buck AK, Kropf S, Schwaiger M, Keller U, Lassmann M, Wester HJ. 2017. [(177)Lu]pentixather: Comprehensive Preclinical Characterization of a First CXCR4-directed Endoradiotherapeutic Agent. *Theranostics*, 7 (9):2350-2362.
- Seiler T, Herfarth K, Klapper W, Dreyling M. 2016. Therapie der indolenten Non-Hodgkin-Lymphome. In: Adamietz IA, Bechstein WO, Christiansen H, Doehn C, Hochhaus A, Hofheinz R-D, Lichtenegger W, Lordick F, Schadendorf D, Untch M, Wittekind C, Hrsg. *Weiterbildung Onkologie: CME-Beiträge aus: Der Onkologe Juli 2014 - Dezember 2015*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 31-41.
- Shin HC, Seo J, Kang BW, Moon JH, Chae YS, Lee SJ, Lee YJ, Han S, Seo SK, Kim JG, Sohn SK, Park TI. 2014. Clinical significance of nuclear factor kappaB and chemokine receptor CXCR4 expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma who received rituximab-based therapy. *Korean J Intern Med*, 29 (6):785-792.
- Shipp M, Harrington D, Anderson J, Yeap B. 1993. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med*, 329 (14):987-994.
- Skrabek P, Turner D, Seftel M. 2013. Epidemiology of Non-Hodgkin Lymphoma. *Transfusion and Apheresis Science*, 49 (2):133-138.
- Smith JR, Falkenhagen KM, Coupland SE, Chipps TJ, Rosenbaum JT, Brazier RM. 2007. Malignant B cells from patients with primary central nervous system lymphoma express stromal cell-derived factor-1. *Am J Clin Pathol*, 127 (4):633-641.
- Spano JP, Andre F, Morat L, Sabatier L, Besse B, Combadiere C, Deterre P, Martin A, Azorin J, Valeyre D, Khayat D, Le Chevalier T, Soria JC. 2004. Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. *Ann Oncol*, 15 (4):613-617.
- Specht E. 2013. Somatostatinrezeptoren in bronchopulmonalen neuroendokrinen Tumoren: Neue Targets in der pathologischen Diagnostik und Therapie [Diplomarbeit]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

- Specht E, Kämmerer D, Sanger J, Wirtz RM, Schulz S, Lupp A. 2015. Comparison of immunoreactive score, HER2/neu score and H score for the immunohistochemical evaluation of somatostatin receptors in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. *Histopathology*.
- Spoo AC, Lubbert M, Wierda WG, Burger JA. 2007. CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 109 (2):786-791.
- Srikant CB, Murthy KK, Patel YC. 1992. Tissue-specific distribution of cross-linked somatostatin receptor proteins in the rat. *The Biochemical journal*, 282 (Pt 2):339-344.
- Stein H. 2000. Die neue WHO Klassifikation der malignen Lymphome. Nach "REAL" ein weiterer Schritt auf dem Weg zu einem weltweiten Konsens. *Der Pathologe*, 21 (2):101-105.
- Stollberg S, Kämmerer D, Neubauer E, Schulz S, Simonitsch-Klupp I, Kiesewetter B, Raderer M, Lupp A. 2016. Differential somatostatin and CXCR4 chemokine receptor expression in MALT-type lymphoma of gastric and extragastric origin. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 142 (11):2239-2247.
- Swerdlow AJ. 2003. Epidemiology of Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30 Suppl 1:S3-12.
- Swerdlow SH. 2013. Lymphoma classification and the tools of our trade: an introduction to the 2012 USCAP Long Course. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 26 Suppl 1:S1-S14.
- Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. 2016. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127 (20):2375-2390.
- Sylvia MT, Dey B, Basu D, Jacob SE, Kar R, Dubashi B. 2016. Follicular Lymphoma: A Clinicopathological Analysis from a Tertiary Care Institute in Southern India. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 8 (1):e2016060.
- Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. 1998. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*, 393 (6685):591-594.
- Taniyama Y, Suzuki T, Mikami Y, Moriya T, Satomi S, Sasano H. 2005. Systemic distribution of somatostatin receptor subtypes in human: an immunohistochemical study. *Endocr J*, 52 (5):605-611.
- Teicher BA, Fricker SP. 2010. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 16 (11):2927-2931.
- Thieblemont C. 2005. Clinical presentation and management of marginal zone lymphomas. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:307-313.
- van den Anker-Lugtenburg PJ, Krenning EP, Oei HY, Van Hagen MP, Gerrits CJ, Reubi JC, Lamberts SW, Lowenberg B. 1996. Somatostatin receptor scintigraphy in the initial staging of Hodgkin's disease. *Br J Haematol*, 93 (1):96-103.
- Varga Z, Diebold J, Dommann-Scherrer C, Frick H, Kaup D, Noske A, Obermann E, Ohlschlegel C, Padberg B, Rakozy C, Sancho Oliver S, Schobinger-Clement S, Schreiber-Facklam H, Singer G, Tapia C, Wagner U, Mastropasqua MG, Viale G, Lehr H-A. 2012. How Reliable Is Ki-67 Immunohistochemistry in Grade 2 Breast Carcinomas? A QA Study of the Swiss Working Group of Breast- and Gynecopathologists. *PLOS ONE*, 7 (5):e37379.
- Vasef MA, Lin Y, Dick F. 2000. Another Lymphoma Classification. *Laboratory Medicine*, 31 (12):679 - 684.
- Volante M, Brizzi MP, Faggiano A, La Rosa S, Rapa I, Ferrero A, Mansueto G, Righi L, Garancini S, Capella C, De Rosa G, Dogliotti L, Colao A, Papotti M. 2007.

- Somatostatin receptor type 2A immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: a proposal of scoring system correlated with somatostatin receptor scintigraphy. *Mod Pathol*, 20 (11):1172-1182.
- von Tresckow B, Plutschow A, Fuchs M, Klimm B, Markova J, Lohri A, Kral Z, Greil R, Topp MS, Meissner J, Zijlstra JM, Soekler M, Stein H, Eich HT, Mueller RP, Diehl V, Borchmann P, Engert A. 2012. Dose-intensification in early unfavorable Hodgkin's lymphoma: final analysis of the German Hodgkin Study Group HD14 trial. *J Clin Oncol*, 30 (9):907-913.
- Wang S, Hartge P. 2010. Epidemiology in non-Hodgkin lymphoma. In: Armitage J, Mauch P, Lee N, Hrsg. Philadelphia: Lipincott Williams & Wilkins.
- Welschinger R, Liedtke F, Basnett J, Dela Pena A, Juarez JG, Bradstock KF, Bendall LJ. 2013. Plerixafor (AMD3100) induces prolonged mobilization of acute lymphoblastic leukemia cells and increases the proportion of cycling cells in the blood in mice. *Exp Hematol*, 41 (3):293-302.e291.
- Weng AP, Shahsafaie A, Dorfman DM. 2003. CXCR4/CD184 immunoreactivity in T-cell non-Hodgkin lymphomas with an overall Th1- Th2+ immunophenotype. *Am J Clin Pathol*, 119 (3):424-430.
- Wester H, Beer A, Keller U, Schottelius M, Hoffmann F, Abbrederis K, Kessler H, Schwaiger M. 2014. Imaging of CXCR4 chemokine receptor expression with [68Ga]pentixafor: First experience in cancer patients. *J NUCL MED MEETING ABSTRACTS*, 55 (1_MeetingAbstracts):118-.
- Wilks S. 1865. Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen (or Hodgkin's disease), with remarks. *Guys Hosp Rep*, 11:56-67.
- Wynick D, Polak JM, Bloom SR. 1989. Somatostatin and its analogues in the therapy of gastrointestinal disease. *Pharmacol Ther*, 41 (1-2):353-370.
- Yamaga LYI, Wagner J, Funari MBG. 2017. 68Ga-DOTATATE PET/CT in Nonneuroendocrine Tumors: A Pictorial Essay. *Clin Nucl Med*, 42 (6):e313-e316.
- Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, Hartikainen J. 2007. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol*, 49 (10):1015-1026.
- Yoshie O. 2013. Chemokine receptors as therapeutic targets. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 36 (4):189-196.
- Zhang Z, Ni C, Chen W, Wu P, Wang Z, Yin J, Huang J, Qiu F. 2014. Expression of CXCR4 and breast cancer prognosis: A systematic review and meta-analysis.
- Zoller F, Eisenhut M, Haberkorn U, Mier W. 2009. Endoradiotherapy in cancer treatment — Basic concepts and future trends. *European Journal of Pharmacology*, 625 (1):55-62.

8 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit soll einen Überblick über die Expressionshäufigkeit und -intensität der Somatostatinrezeptoren SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4 und SSTR5 sowie des Chemokinrezeptors CXCR4 bei malignen Lymphomen geben. Die untersuchten Proben beinhalteten Präparate von Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen.

Es stellte sich heraus, dass die Expression und Kombination der analysierten Rezeptoren zwischen den verschiedenen Entitäten differiert. Der CXCR4 konnte insgesamt bei 49 % der malignen Lymphome nachgewiesen werden. Er wurde damit am häufigsten exprimiert und erreichte im Vergleich zu den SSTR die höchsten Färbintensitäten. Die NHL-Proben exprimierten als prädominanten SST-Rezeptorsubtypen den SSTR2 in 29 % der Fälle, gefolgt von dem SSTR3 bei 22 % der untersuchten NHL-Präparate. Der SSTR1 wurde nur selten (9 % der Fälle) nachgewiesen. Die IRS-Werte des SSTR4 und des SSTR5 lagen durchweg im Rezeptor-negativen Bereich.

Im Gegensatz dazu hatten beide HL-Präparate positive IRS-Werte für den SSTR5. Einer der Fälle exprimierte zusätzlich den CXCR4. Alle weiteren Somatostatin-Rezeptorsubtypen waren bei den HL-Präparaten negativ. Auffällig war die positive Färbereaktion der HSR-Zellen für den SSTR2, während die restlichen Zellen der Tumorkläsionen den Rezeptor nicht exprimierten. Aufgrund des geringen prozentualen Anteils der HSR-Zellen an der Tumorkläsion lag der IRS-Wert der Proben jedoch trotzdem im Rezeptor-negativen Bereich. Bezüglich der Tumorkläsion wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Expression des SSTR3 und extranodalem Gewebe ermittelt. Insgesamt waren 30 % der extranodalen Kläsionen positiv für diesen Rezeptor, während ihn nur 10 % der betroffenen Lymphknoten exprimierten. Möglicherweise kommt der SSTR3 vorwiegend in Kläsionen vor, die außerhalb von Lymphknoten liegen. Für die Lokalisation von befallenen Lymphknoten unterhalb des Diaphragmas wurde eine Tendenz für das Auftreten des SSTR1 gefunden. Die Expression der SST-Rezeptorsubtypen könnte demnach in Abhängigkeit mit dem befallenen Gewebe stehen und sollte in künftigen Studien weiter berücksichtigt werden. Außerdem waren beide Knochenmarkbiopsien positiv für den SSTR1, was an größeren Fallzahlen untersucht werden sollte, um sie möglicherweise einer Behandlung mit Pasireotid zugänglich zu machen.

Bei der Auswertung der Ergebnisse konnte kein Rezeptor gefunden werden, der speziell von einer bestimmten Entität der NHL exprimiert wird. Ein Großteil der Proben war jedoch nicht

weiter spezifiziert, wodurch die genaue Klassifikation nicht bekannt war und eine mögliche Korrelation verschleiert worden sein könnte. Der SSTR5 wurde jedoch ausschließlich bei den HL-Präparaten gefunden. Die Intensität für diesen Rezeptor war allerdings sehr schwach.

Die mittels Immunhistochemie gefundenen Expressionsmuster ergaben bei 3/45 NHL-Präparaten positive Färberaktionen für den SSTR3 und den CXCR4. Wesentlich häufiger war hingegen die alleinige Expression des CXCR4 (14/45 der NHL), des SSTR2 (6/45 der NHL) und des SSTR3 (4/45 der NHL). Insgesamt neun Lymphom-Proben exprimierten keinen der analysierten Rezeptoren. Eine signifikante Koexpression von Rezeptorsubtypen miteinander konnte nicht beobachtet werden.

Der Proliferationsmarker Ki-67 lag für die NHL durchschnittlich bei 24,69 %. Die Patienten mit einem HL erreichten einen Proliferationsindex von 14,28 % und 21,28 %. Signifikante Korrelationen wurden mit dem Grading und dem Überleben der Patienten gefunden. Dieses Ergebnis war zu erwarten und wurde bereits durch andere Studien belegt, da eine hohe Teilungsrage ebenfalls ein höheres histologisches Grading bedingt, die Tumorprogression begünstigt und damit die Prognose des Patienten verschlechtert.

Maligne Lymphome haben bekannterweise eine hohe CXCR4-Expression, was auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde. Da der CXCR4 eine wichtige Rolle bei der Progression, Invasivität und Metastasierung von Tumoren besitzt, hat die Evaluierung von Lymphom-Entitäten mit geeigneten Expressionscharakteristika einen großen Stellenwert in aktuellen Forschungen. Die Durchführung einer PET/CT mit ⁶⁸Ga-Pentixafor stellt zum Beispiel eine Möglichkeit zur nicht-invasiven Diagnostik bestimmter Entitäten oder bei komplexen Patienten dar. Denkbar ist auch ein theranostischer Ansatz durch die Bildgebung und gleichzeitige therapeutische Bestrahlung mit radioaktiv markierten CXCR4-Antagonisten durch ¹⁷⁷Lu-Pentixather. Erste Untersuchungen an Patienten mit Multiplem Myelom liegen bereits vor. Der Einsatz bei weiteren NHL-Entitäten ist in Zukunft nicht auszuschließen und kann durch die vorliegende Studie bekräftigt werden.

Da in dieser Übersichtsstudie verschiedene NHL-Entitäten gesammelt betrachtet wurden, sind für einzelne histologische Subtypen differenzierte Aussagen nur schwer möglich. Daher sind weitere Forschungen erforderlich, um zu untersuchen, welche Entitäten die jeweiligen Rezeptorsubtypen exprimieren.

Es wäre erfreulich, wenn weitere Fallzahlen spezifischer Lymphom-Subtypen, vor allem für die Entität der Hodgkin-Lymphome untersucht würden, um die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse überprüfen und vergleichen zu können. Sollte sich die Expression von SSTR5 bei

den HL bestätigen, wäre eine Therapie mit radioaktiv markiertem Pasireotid denkbar. Außerdem reagieren die meisten Lymphom-Entitäten sehr strahlensensibel, weshalb trotz der eher geringen Expression von Somatostatinrezeptoren, die Möglichkeit einer Peptid-vermittelten Radiorezeptorthherapie mit SST-Analoga bei ausgewählten Patienten prinzipiell nicht verworfen werden sollte.

9 Anhang

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau apl. Prof. Dr. med. Amelie Lupp,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers