

Charakterisierung der Expression des
Somatostatin-Rezeptors 4 in normalen und
neoplastischen humanen Geweben
mit Hilfe eines neuen
monoklonalen Kaninchen-Antikörpers

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Blanca Ehms

geboren am 26.03.1995 in Jena

Gutachter:

1. apl. Prof. Dr. med. Amelie Lupp, Jena
2. PD Dr. med, Daniel Kämmerer, Bad Berka
3. PD Dr. med. Sebastian Krug, Halle (Saale)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.03.2022

3. Staatsexamensprüfung: 23./24.06.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	ii
Abkürzungsverzeichnis	iii
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Somatostatin	3
2.2. Somatostatin- Rezeptoren	4
2.2.1. Einteilung	4
2.2.2. Aufbau und Struktur	5
2.2.3. Vorkommen	6
2.2.4. Signalmechanismen, Wirkung und Verhalten der Somatostatin-Rezeptoren.....	7
2.3. Somatostatin- Analoga	12
2.4. Antikörper	15
2.5. Die Herstellung monoklonaler Antikörper	18
3. Zielstellung	22
4. Material und Methoden	23
4.1. Gewebeproben	23
Votum der Ethikkommission	24
Geräte und Materialien zu Probenaufbereitung	24
4.2. Immunhistochemie	24
4.2.1. Materialien und Gerätschaften für die Immunhistochemie	24
4.2.2. Prinzip der Immunhistochemie	27
4.2.3. Durchführung der immunhistochemischen Färbung der Paraffinschnitte	28
4.2.4. Auswertung der Immunhistochemie	32
4.3. Statistische Auswertung der immunhistochemisch analysierten neuroendokrinen Tumore	33
5. Ergebnisse	34
5.1. Immunhistochemische Untersuchungen	34
5.1.1. Immunhistochemische Untersuchung der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression in humanen Normalgeweben	34
5.1.2. Immunhistochemische Untersuchung der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression in humanen Tumorgeweben	46
5.2. Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse in den humanen Tumorgeweben	64

5.3. Immunhistochemische Untersuchung der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression in humanen bronchopulmonalen und gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien.....	66
5.3.1. Allgemeine Patientendaten	66
5.3.2. Klinische Daten	66
5.3.3. Somatostatin-Rezeptor-4-Expression und klinische Daten.....	71
6. Diskussion.....	80
6.1. Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Normalgeweben	80
6.2. Immunhistochemische Untersuchungen an menschlichen Tumoren.....	90
6.3. Somatostatin-Rezeptor-4-Expression in neuroendokrinen Neoplasien	109
6.3.1. Allgemeine Patientendaten und klinische Daten	109
6.3.2. Somatostatin-4-Rezeptor-Expressionsprofil.....	111
6.3.3. Zusammenhang zwischen der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression und den klinischen Daten	111
7. Schlussfolgerungen	113
8. Literaturverzeichnis	115
9. Anhang.....	123
9.1. Ehrenwörtliche Erklärung	123
9.2. Danksagung	124

Abkürzungsverzeichnis

AC	Atypisches Karzinoid der Lunge
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
BCI 2	B-cell-lymphoma 2 (B-Zell-Lymphom 2) (Protein)
BP-NEN	bronchopulmonale neuroendokrine Neoplasie
BP-NET	bronchopulmonaler neuroendokriner Tumor
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
cAMP	zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat
CCC	cholangiocellular carcinoma (cholangiozelluläres Karzinom)
CXCR4	CXC-Motiv Chemokinrezeptor 4
DAG	Diacylglycerol
DR4	death receptor 4 (Todesrezeptor 4)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GEP-NEN	gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasie
GEP-NET	gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumor
GH	Growth-Hormon (Wachstumshormon)
GHRH	Growth-Hormon-Releasing-Hormon
GIST	Gastrointestinaler Stroma-Tumor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
HCC	hepatocellular carcinoma (hepatozelluläres Karzinom)
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IP3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IRS	Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner
mAB	monoclonal antibody (monoklonaler Antikörper)
MAP	mitogen-activated protein
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
NEN	neuroendokrine Neoplasie
NET	neuroendokriner Tumor
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -exchanger
nNOS	neuronal nitric oxide synthetase (Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthetase)
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatasen
SCLC	small cell lung cancer (kleinzelliges Lungenkarzinom)
SS	Somatostatin
SSA	Somatostatin-Analoga
SST	Somatostatinrezeptor

STAT	signal transducer and activator of transcription
TC	Typisches Karzinoid der Lunge
TNF-1	Tumor-Nekrose-Faktor 1
VIP	vasoaktives intestinales Peptid

1. Zusammenfassung

Somatostatin (SS) ist ein zyklisches Peptidhormon, welches in seinen zwei bioaktiven Formen SS-14 und SS-28 weit verbreitet im Körper vorkommt. Es vermittelt verschiedene inhibitorische Wirkungen, unter anderem die Hemmung der Sekretion verschiedener Hormone und Neurotransmitter sowie eine Verminderung der Zellproliferation. Diese Effekte bewirkt Somatostatin über die Bindung an G-Protein-gekoppelte Somatostatin-Rezeptoren (SST), von welchen fünf Subtypen bekannt sind: SST1 bis SST5. Neben einer Expression in zahlreichen gesunden Organen und Geweben, findet sich ein SST-Vorkommen oder sogar eine Überexpression dieser Rezeptoren auch in verschiedenen Malignomen, insbesondere den neuroendokrinen Tumoren (NETs). Dies stellt die Grundlage für die Rezeptor-basierte Diagnostik und die Therapie dieser Neoplasien mit Somatostatin-Analoga dar.

Während in Bezug auf die anderen SST-Subtypen seit vielen Jahren umfassende Untersuchungen mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper vorgenommen werden konnten, ist über den SST4 bislang nur wenig bekannt. Die wenigen bisherigen Erkenntnisse stützen sich dabei auf die Analyse der mRNA-Expression und immunhistochemische Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern.

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, mit dem kürzlich vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie in Zusammenarbeit mit ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) neu generierten, vielversprechenden monoklonalen Kaninchen-Anti-SST4-Antikörper 7H49L61 immunhistochemische Färbungen an einer Vielzahl von in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten menschlichen normalen und neoplastischen Geweben sowie an einer großen Serie neuroendokriner Tumore vorzunehmen. Die immunhistochemisch gefärbten Tumorpräparate wurden lichtmikroskopisch analysiert und mit Hilfe des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner (IRS), in welchen sowohl die Farbintensität als auch der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen einfließen, semiquantitativ bewertet. Bei den neuroendokrinen Tumoren wurde das Ausmaß der SST4-Expression zudem mit den klinischen Daten der Patienten korreliert.

Neben der Erstellung eines ersten umfassenden Expressionsprofils des SST4 in gesunden und neoplastischen menschlichen Geweben sollte abschließend eine weitere Charakterisierung des neuen monoklonalen Anti-SST4-Antikörpers 7H49L61 erfolgen, indem dessen Spezifität durch Positivkontrollen, Peptidneutralisationen und Ergebnisvergleiche mit bisherigen Literaturangaben und Studienresultaten bewertet werden sollte.

Im Ergebnis der vorliegenden Untersuchungen konnte der SST4 in einer Vielzahl von gesunden und neoplastischen menschlichen Geweben nachgewiesen werden, wobei sich das Ausmaß der SST4-Expression im Vergleich zur Expression der anderen SST-Subtypen in den meisten Geweben nur gering bis mäßig zeigte. Ein vergleichsweise hohes Vorkommen des

SST4 konnte im gesunden menschlichen Cortex, in der Neurohypophyse, in der Nebenschilddrüse, im Bronchialepithel, in der Nebennierenrinde, im Magen-Darm-Trakt und in den Ganglienzellen beobachtet werden. In den untersuchten neoplastischen Geweben des Menschen konnten die höchsten Expressionsraten in absteigender Reihenfolge in den Nebenschilddrüsenadenomen, den Magenkarzinomen, den Glioblastomen, den Phäochromozytomen und für die Pankreaskarzinome ermittelt werden.

In nahezu jeder SST4-exprimierenden Tumorentität wurde dabei eine teils sehr hohe individuelle Variabilität zwischen den analysierten Präparaten bezüglich der SST4-Expression festgestellt. Bezeichnend war ein oft intensiveres SST4-Auftreten an den Wachstumszonen der Tumore, wohingegen das Tumorrinnere und die stärker entarteten Tumorareale eine abnehmende SST4-Expression bis hin zu einem Verschwinden des Rezeptors aufwiesen. So ist davon auszugehen, dass die SST4-Expression eines Tumors von noch weitestgehend unbekanntem individuellen Faktoren und Zellsignalwegen abhängig ist, wobei jedoch mit dem Fortschreiten der Entartung eines Tumors ein zunehmender Verlust der SST4-Expression einzutreten scheint.

Im Hinblick auf die neuroendokrinen Tumore scheint der SST4 eine sehr unterschiedliche Bedeutung für die verschiedenen Subentitäten zu spielen. Während die SST4-Expression in den gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NEN) mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben sowie anderen negativen prognostischen Markern assoziiert war, konnte der Rezeptor in den bronchopulmonalen NEN (BP-NEN) statistisch signifikant mit einem besseren Überleben und einer geringeren Zellteilungsrate in Verbindung gebracht werden. Ebenfalls konnte eine statistisch signifikant unterschiedliche Expressionsstärke des SST4 zwischen den NEN des Pankreas und den NEN des Ileums oder der Appendix sowie zwischen den NEN des Rektums und den NEN des Ileums ermittelt werden. Diesem Befund könnte zukünftig bei der klinisch-diagnostischen Suche nach dem Primärtumor eine Bedeutung zukommen.

Insgesamt konnte durch die vorliegende Arbeit ein weiterer wichtiger Beitrag zur Aufklärung der SST4-Expression in gesunden und neoplastischen menschlichen Geweben geleistet werden. Der dabei erstellte umfassende Überblick über die SST4-Expression im gesunden menschlichen Gewebe sowie in einer Vielzahl von menschlichen Tumorentitäten schafft eine gute Grundlage für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen klinischen Bedeutung dieses Rezeptors für verschiedene Erkrankungen und Tumorleiden. Für einige dieser Erkrankungen und Tumorleiden könnten sich so in Zukunft neue diagnostische und therapeutische Optionen ergeben. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete und charakterisierte monoklonale SST4-Antikörper 7H49L61 kann aufgrund seiner hohen Spezifität für den zukünftigen Einsatz in Analysen zur Expression und Regulation des SST4 empfohlen werden.

2. Einleitung

2.1. Somatostatin

Das humane Somatostatin-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 3 codiert. Das Präproprotein des Somatostatins umfasst 116 Aminosäuren und nach einem ersten enzymatischen Abspaltungsprozess durch Präprokonvertasen als inaktives Pro-Somatostatin noch 92 Aminosäuren. Beide aktive Formen des Neuropeptids Somatostatin, das Somatostatin-14 (SS-14) und das Somatostatin-28 (SS-28), werden aus diesem Vorläuferprotein gebildet. Dabei ist das SS-28 im Vergleich zum SS-14 N-terminal um 14 weitere Aminosäuren verlängert. Beide Formen bilden durch hochkonservierte Disulfidbrücken eine zyklische Struktur (Sun und Coy 2016, Solarski et al. 2019).

Seine inhibitorische Wirkung realisiert Somatostatin im menschlichen Körper über die Bindung an G-Protein-gekoppelte Somatostatinrezeptoren, von welchen 5 Subtypen bekannt und mit SST1 bis SST5 benannt sind. Hierbei weisen beide aktive Formen des Somatostatins eine Bindungsaffinität zu allen Rezeptor-Subtypen auf, wobei es hier Rezeptor-Subtyp-abhängige Unterschiede gibt und z.B. das SS-28 im Vergleich zum SS-14 eine 10-fach höhere Bindungsaffinität zum SST-5 zeigt (Sun und Coy 2016, Solarski et al. 2019).

Im menschlichen Körper zeigt Somatostatin ein breites Wirkspektrum sowohl im Zentralen Nervensystem als auch in peripheren Geweben. Es nimmt Einfluss unter anderem auf den Hippocampus, verschiedene Cortex-Areale, die Hypophyse, die Nebenniere und den Pankreas. Eine gewebespezifische Wirkung wird dabei über die unterschiedliche Expression der verschiedenen Rezeptor-Subtypen ermöglicht, wobei mehrere Subtypen parallel vorliegen können (Srikant et al. 1992, Theodoropoulou und Stalla 2013).

Die Wirkung des Somatostatins umfasst viele inhibitorische Funktionen: Es bewirkt unter anderem eine Hemmung der Ausschüttung des Wachstumshormons GH sowie des Thyroidea-Stimulierenden Hormons TSH aus der Hypophyse, weswegen es auch unter dem Namen somatotropin release-inhibiting factor (SRIF) bekannt und beschrieben ist. Ebenfalls spielt Somatostatin eine regulierende Rolle bei der Exzitabilität hippocampaler Areale und besitzt einen hemmenden Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit und somit das epileptogene Potenzial (Qiu et al. 2008, Zeyda und Hochgeschwender 2008).

Im Verdauungstrakt inhibiert Somatostatin die Ausschüttung gastrointestinaler Hormone, Enzyme und Neuropeptide. Es moduliert beispielsweise die Dauer der Magenentleerung, nimmt Einfluss auf die Kontraktion der glatten Muskulatur und auf die intestinale Durchblutung und die intestinale Absorption (Lamers 1987, Theodoropoulou 2013).

Auch bei der Regulation von Zellwachstum und Zellproliferation besitzt Somatostatin eine hemmende Funktion. Es inhibiert den Wachstumsprozess und die Angiogenese und kann zudem Apoptose induzieren (Chalabi et al. 2014, Sun und Coy 2016).

Die hemmende Wirkung des Somatostatins konnte nicht nur in gesundem Gewebe, sondern auch in entarteten Zellen und soliden Tumoren beobachtet werden. Der anti-proliferative und inhibierende Effekt wurde zur Grundlage für die Therapie mit Somatostatin-Analoga, welche zur Behandlung von beispielsweise der Akromegalie und dem Cushing-Syndrom oder von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren eingesetzt werden und weiterhin Gegenstand aktueller Forschung darstellen (Chalabi et al. 2014, Sun und Coy 2016).

Somatostatin besitzt in seinen natürlichen Formen eine Halbwertszeit von 1-2 Minuten (Pallai et al. 1983).

2.2. Somatostatin-Rezeptoren

2.2.1. Einteilung

Bei den Somatostatin-Rezeptoren werden 5 Subtypen unterschieden, welche als SST1 bis SST5 bezeichnet werden. Diese einzelnen Subtypen sind auf verschiedenen Genloci auf den Chromosomen 14, 17, 22, 20 und 16 codiert und besitzen, mit Ausnahme des SST2, keine Introns. Ein sechster Subtyp, der SST6, scheint in Säugetieren verloren gegangen zu sein, konnte aber in einigen Fischarten nachgewiesen werden (Ocampo Daza et al. 2012, Gunther et al. 2018).

Aufgrund ihrer Phylogenese, ihrem strukturellen Charakter und ihren pharmakologischen Eigenschaften werden die Subtypen nochmals in 2 Klassen untergliedert: Zu der einen Klasse gehören der SST2, der SST3 und der SST5, welche eine hohe Bindungsaffinität sowohl für ihre natürlichen Liganden als auch für zyklische Peptide wie Octreotid oder Seglitid zeigen. Zu der anderen Klasse gehören der SST1 und der SST4, die zwar eine hohe Bindungsaffinität für die natürlichen Liganden aufweisen, zyklische Peptide jedoch mit nur sehr geringer Affinität binden (Schoeffter et al. 1995, Gunther et al. 2018).

Aus dem ein Intron enthaltenden SST-2-Gen können durch alternatives Spleißen der SST2A und der SST2B generiert werden, welche sich in der Länge und in der Sequenz des C-terminalen Endes unterscheiden. Im Menschen kommt ausschließlich der SST2A vor, während in Nagetieren beide SST2-Varianten gefunden werden konnten (Zou et al. 2019, Gunther et al. 2018).

2.2.2. Aufbau und Struktur

Die Somatostatin-Rezeptoren (SST) wurden erstmals 1978 als spezifische Rezeptoren für das Polypeptidhormon Somatostatin in den Zellen von Rattenhypophysen gefunden und beschrieben (Schonbrunn und Tashjian 1978).

Alle Somatostatin-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und somit zur größten Familie der Plasma-Membran-Proteine. GPCRs vermitteln die meisten hormonellen und Neurotransmitter-regulierten Prozesse im menschlichen Körper; unter anderem den Geruchs- und Geschmackssinn, das Sehvermögen sowie den Wachstumsimpuls des GH (Rosenbaum et al. 2009).

GPCRs besitzen 7 hydrophobe alpha-Helix-Transmembrandomänen, welche über alternierende intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. In der zweiten intrazellulären Schleife findet sich typischerweise das E/DRY-Motiv, dessen Aminosäuresequenz (Glutamat/Aspartat-Arginin-Tyrosin) eine regulierende Funktion in der Konformationsstabilität des GPCRs zukommt. Das N-terminale Ende der Rezeptorproteine ist extrazellulär gelegen und spielt für die spezifische Liganden-Bindung eine entscheidende Rolle. Das C-terminale Ende befindet sich intrazellulär und interagiert dort mit den heterotrimeren Guanin-Nukleotid-bindenden Proteinen (Rovati et al. 2007, Rosenbaum et al. 2009, Weis und Kobilka 2018).

Bindet ein Ligand an einen GPCR, wird eine bestimmte Rezeptor-Konformation stabilisiert, welche mit dem gekoppelten G-Protein interagiert und an der α -Untereinheit den Austausch von GDP zu GTP fördert. Durch diesen Austausch und der damit verbundenen Aktivierung dissoziiert die α -Untereinheit von der $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins. Beide Untereinheiten bewirken separat voneinander nachfolgende intrazelluläre Wirkkaskaden (Weis und Kobilka 2018).

Die durch die Konformationsstabilisierung und G-Protein-Dissoziation ausgelösten Signaltransduktionswege der GPCRs können multiple und komplexe Wirkweisen umfassen, parallel zueinander ablaufen und in ihrem Effekt und ihrer Effektstärke erheblich variieren. Allein innerhalb der Gruppe der Somatostatin-Rezeptoren sind für die einzelnen Subtypen unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionswege bekannt, welche durch die Bindung des Liganden initiiert werden. So agieren beispielsweise alle Subtypen über eine Inhibition der Adenylatcyclase und eine Aktivierung der Phosphotyrosin-Phosphatase, doch nur der SST1 und der SST2 zeigen eine Wirkung auf spannungsabhängige Kalzium-Kanäle (Patel 1999, Rosenbaum et al. 2009, Gunther et al. 2018, Picard et al. 2019).

Die SST gehören zum Prototyp der Gruppe A der GPCRs, welche wiederum alle zur Rhodopsin-like-Rezeptor-Familie gehören. Die SST besitzen unterschiedliche Sequenzlängen, wobei der SST5 mit 364 Aminosäuren den kleinsten und der SST3 mit 418

Aminosäuren den längsten Somatostatin-Rezeptor darstellt (Rosenbaum et al. 2009, Gunther et al. 2018).

Die Gene der Somatostatin-Rezeptoren sind hochkonserviert. So findet sich bei der Isoform SST1 eine 94-98%ige Sequenz-Identität bei Mensch, Maus und Ratte. Bei der SST4-Isoform von Ratte und Mensch beträgt die Sequenz-Identität 88%. Untereinander weisen die Subtypen der Somatostatin-Rezeptoren eine Sequenz-Identität von 39-57% auf (Gunther et al. 2018).

Gemeinsam ist allen SST die konservierte Sequenz YANSCANPILY in der Transmembranregion 7, welche in der Literatur auch als „Mammalian SST signature“ bezeichnet wird und Säugetierspezies-übergreifend sowie im Menschen vorkommt. Ebenso findet sich am Ende des C-Terminus das in allen SST von Säugetier und Mensch übereinstimmende Motiv X-[S/T]-X-Φ, welches eine wichtige Domäne für die Bindung intrazellulärer Gerüstproteine darstellt (Gunther et al. 2018).

Trotz insgesamt hoher Bindungsaffinität zu beiden natürlichen Liganden SS-14 und SS-28 finden sich rezeptorabhängig Affinitätsunterschiede. So bindet beispielsweise der SST4 den Liganden SS-14 mit einer höheren Affinität als SS-28, während es sich bei dem SST5 umgekehrt verhält (Bruno et al. 1992, Patel 1999, Qiu et al. 2008, Picard et al. 2019).

Die spezifische Ligandenbindung erfolgt für alle Liganden über die Sequenz der 4 Aminosäuren FWKT, also Phenylalanin-Tryptophan-Lysin-Threonin (Gunther et al. 2018, Solarski et al. 2019).

2.2.3. Vorkommen

SST kommen im menschlichen Körper weit verbreitet vor, wobei ein Gewebetyp meist mehrere Subtypen parallel exprimiert. Die verschiedenen SST-Subtypen können sogar in einzelnen Zellen koexistierend gefunden werden: Beispielsweise zeigt sich ein überlappendes Vorkommen der SST-Subtypen in zahlreichen Arealen des Gehirns und des endokrinen Systems. Hierbei kann die Expression der einzelnen SST-Subtypen auf subzellulärer Ebene variieren (Patel 1999, Lanneau et al. 2000, Gunther et al. 2018).

Im ZNS werden alle SST exprimiert, die einzelnen Subtypen aber in unterschiedlicher Expressionsstärke. Unter anderem konnte in den Neuronen des Hypothalamus ein vorherrschendes Vorkommen insbesondere von SST1 und SST2, nachgewiesen werden. Alle Subtypen werden zudem in den Neuronen des Cortex, in der Amygdala, dem Nucleus arcuatus und dem Nucleus paraventricularis gefunden, wobei der SST4 bisherigen Forschungsarbeiten zufolge dabei das niedrigste Auftreten zeigt.

In den pankreatischen Inselzellen spielen die Subtypen SST2 und SST5 eine wichtige Rolle in der Sekretionshemmung von Glukagon und Insulin. SST werden außerdem in den Zellen der Nebenniere, in enterischen Ganglienzellen, in Zellen des Magens und der Lunge, im

Schilddrüsengewebe, in den Nieren, in Zellen des Immunsystems sowie weiteren Geweben exprimiert. Dabei zeigt der SST2 das breiteste Vorkommen und die stärkste Expression in den meisten dieser Gewebe (Patel 1999, Lanneau et al. 2000, Sun und Coy 2016, Gunther et al. 2018).

Auch Tumorzellen, welche von SST-exprimierenden Geweben abstammen, können eine SST-Expression aufweisen. So konnten die verschiedenen SST-Subtypen sowohl in neuroendokrinen als auch in nicht-neuroendokrinen Tumoren wie beispielsweise dem HCC, dem Mamma-Karzinom oder dem Pankreas-Karzinom aufgefunden werden. Auch wurde in einer Studie mit 160 duktalem Mamma-Karzinom-Gewebe-Proben in 90% der Fälle eine SST1-Expression sowie in 71% der Tumore eine SST4-Expression nachgewiesen, welche sich unabhängig vom Patientenalter und Tumorstadium zeigte (Zou et al. 2019).

Die SST-Expression in Tumoren stellt die molekulare Grundlage für Erforschung und Entwicklung von Somatostatin-Analoga als spezifischen Therapie-Ansatz bei diesen Erkrankungen dar. Allerdings kann das Auftreten der SST in den Tumorgeweben stark variieren und letztlich kann es auch zu einem Verlust der SST-Expression im Tumor kommen, was neben weiteren und bisher noch ungeklärten Faktoren die unterschiedliche Therapie-Erfolgsquote bei der Behandlung mit Somatostatin-Analoga erklärt (Zou et al. 2019).

2.2.4. Signalmechanismen, Wirkung und Verhalten der Somatostatin-Rezeptoren

Die Somatostatin-Rezeptoren vermitteln die generell inhibitorischen Wirkungen ihres Liganden Somatostatin über verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionswege, wobei diese sich zwischen den einzelnen SST-Subtypen unterscheiden.

Gemeinsam ist allen SST die Kopplung an Pertussis-Toxin-sensible G_i -Proteine sowie die dadurch unter anderem vermittelte Hemmung der Adenylatcyclase. Die resultierende zytosolische Konzentrationsabnahme an cAMP bewirkt eine Inhibition der Exozytose und somit der Sekretionsvorgänge in Zellen. Alle SST-Subtypen sind zudem in der Lage, verschiedene Kalium-Kanäle der Zelle zu aktivieren, worauf eine Hyperpolarisation der Zellmembran und eine Hemmung des spannungsabhängigen Ca^{2+} -Ionen-Einstroms folgt. Die verminderte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration führt ebenfalls zu einer Hemmung der Exozytose sekret-haltiger Vesikel.

Ein weiterer Hemmeffekt auf die Sekretionsvorgänge in den Zellen wird durch eine direkte Aktivierung von K^+ -Kanälen sowie eine direkte Inhibition von Ca^{2+} -Kanälen durch die SST 1, 2, 4 und 5 erreicht. Im weiteren Signaltransduktionsweg spielt dabei die Ca^{2+} -aktivierte Phosphatase Calcineurin eine Rolle (Theodoropoulou und Stalla 2013).

Einen Überblick über die verschiedenen Signaltransduktionswege der SST-Subtypen gibt die folgende Darstellung von Theodoropoulou und Stalla (2013):

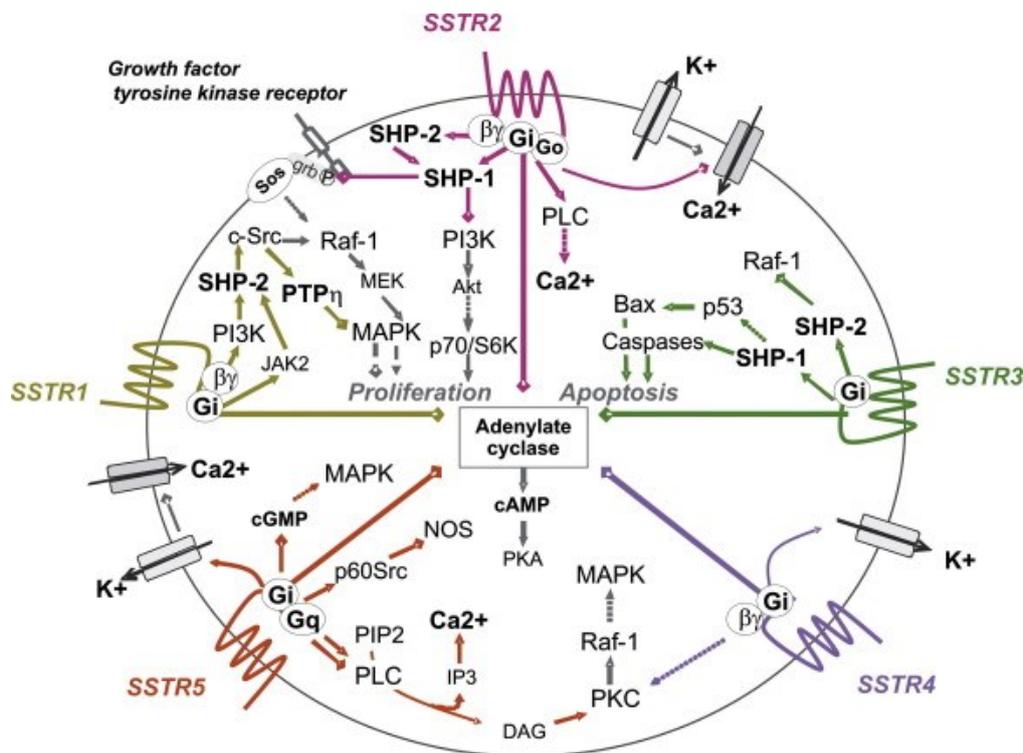


Abbildung 1: Somatostatinrezeptoren: vom Signalweg bis zur klinischen Anwendung (Theodoropoulou und Stalla 2013).

SST1

Der SST1 kommt insbesondere im ZNS und im Pankreasgewebe vor. Er vermittelt als einziger SST eine direkte Hemmung der spannungsabhängigen Ca²⁺-Kanäle vom N-Typ und inhibiert über diesen Mechanismus unter anderem die Insulin-Sekretion in den pankreatischen Inselzellen sowie die Ausschüttung des Wachstumshormons GH in der Hypophyse.

Des Weiteren stimuliert der SST1 über die Aktivierung von Tyrosin-Kinasen sowie Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) die intrazelluläre Mitogen-activated-protein-Kinase (MAP-Kinase), welche Einfluss auf Zellwachstum und Proliferation nimmt und über verschiedene intrazelluläre Signalwege diese Vorgänge unterbinden und herunterregulieren kann. SST1 besitzt durch diese MAP-Kinasen-Aktivierung antiproliferative Eigenschaften (Pola et al. 2003, Lupp et al. 2013, Theodoropoulou und Stalla 2013, Gunther et al. 2018).

In SST1-Knock-out-Mäusen war eine signifikant reduzierte Bindung radioaktiv-markierter selektiver SST1-Liganden nur in der Substantia nigra zu beobachten. Eine kompensatorische Hochregulation des SST2 im Hippocampus der SST1-Knockout-Mäuse sowie die daraus folgenden funktionellen Konsequenzen einer veränderten Membran-Erregbarkeit durch eine Hemmung spannungsabhängiger K⁺-Kanäle und eine verminderte Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat konnte in mehreren Forschungsarbeiten nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde durch die hochregulierte SST2-Expression kein vermehrtes Auftreten

epileptischer Anfälle beobachtet, wie es bei einem Fehlen des SST1 zu erwarten gewesen wäre.

Trotz einer theoretisch reduzierten GH-Inhibition zeigten die Knockout-Tiere ein vermindertes Körpergewicht sowie eine Wachstumsretardierung. Insbesondere ältere Knock-out-Mäuse wiesen zudem eine erhöhte Glucosetoleranz sowie einen gesteigerten Insulinspiegel auf (Zeyda und Hochgeschwender 2008).

Der SST1 liegt als Monomer vor. Eine Heterodimerisierung wird nur in Ko-Expression mit dem SST2 oder dem SST5 beobachtet. Nach Agonist-Bindung lässt sich eine β -Arrestin-unabhängige Internalisierung des Rezeptors beobachten. Der Recycling-Prozess findet ohne lysosomale Zersetzung des Liganden statt (Theodoropoulou und Stalla 2013, Gunther et al. 2018).

SST2

Der SST2 ist der am meisten untersuchte und somit auch der am besten verstandene SST und ist aus diesem Grund seit vielen Jahren ein Haupt-Target für die Entwicklung und den Einsatz von Somatostatin-Analoga (Theodoropoulou und Stalla 2013).

Der SST2 findet sich in zahlreichen Arealen des ZNS. In der Hypophyse nimmt er, gemeinsam mit dem SST1, einen hemmenden Einfluss auf die Ausschüttung des Wachstumshormons GH. Eine besondere Rolle scheint der SST2 in der Retina zu spielen, wo er das Überleben der bipolaren Zellen maßgeblich beeinflusst. Er wirkt auch bei der Regulation der Dopamin- und Glutamat-Ausschüttung in der Retina mit (Zeyda und Hochgeschwender 2008, Gunther et al. 2018).

Der SST2 findet sich in der submukösen Muskelschicht sowie in den Nervenplexus des Gastrointestinal-Traktes, wo er unter anderem die Magensäure-Sekretion hemmt und Einfluss auf die Zusammensetzung des Gallesekretes nimmt. In den α -Inselzellen des Pankreas hemmt er die Ausschüttung von Glukagon und besitzt somit einen anti-diabetischen Effekt. Der SST2 vermittelt nachgewiesenermaßen eine antiinflammatorische Wirkung auf Monozyten und Makrophagen, unter anderem durch deren Inaktivierung (Zeyda und Hochgeschwender 2008, Gunther et al. 2018).

Neben einer direkten Inhibition von Ca^{2+} -Kanälen nimmt der SST2 über die Aktivierung der PLC Einfluss auf die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration. Seine antiproliferative Wirkung bewirkt der SST2 über eine Regulierung des MAP-Kinase-Weges sowie über eine Aktivierung der JAK-2-Thyrosin-Kinasen; seine anti-invasive Wirkung, insbesondere in Tumorzellen, erzielt er unter anderem über eine inhibitorisch wirkende Dephosphorylierung des E-Cadherins. Über eine Hemmung des anti-apoptischen B-Zell-Lymphom-Proteins (BCI2), eine Aktivierung des p53-Tumorsuppressor-Gens, eine Hochregulation des Todesrezeptors 4 (DR4)

und des Tumor-Nekrose-Faktors 1 (TNF-1), kann der SST2 zudem die Apoptose von Zellen induzieren (Theodoropoulou und Stalla 2013, Gunther et al. 2018).

Im inaktivierten Zustand liegt der SST2 sowohl als Homodimer wie auch als Multimer vor. Bindet der Ligand, dissoziiert der Rezeptor in Monomere. Bei einer Ko-Expression von SST2 und SST3 formen die Rezeptoren Heterodimere, wobei der SST2 die Wirkung des SST3 zu unterdrücken scheint (Gunther et al. 2018).

SST3

Der SST3 war der erste SST, bei welchem ein pro-apoptotischer Effekt, vermittelt durch eine Hochregulation von p53 sowie des pro-apoptotischen Bax-Proteins, beobachtet und beschrieben wurde. Er ist außerdem der einzige SST mit einer hemmenden Wirkung auf VEGF (Theodoropoulou und Stalla 2013).

In SST3-Knock-out-Mäusen wurde, im Gegensatz zu SST2- und SST4-Knock-out-Tieren, ein schweres Defizit in der Merkfähigkeit beobachtet, was auf eine grundlegende Rolle des SST3 bei in der Konsolidierung des Lang- und Kurzzeit-Gedächtnisses in der Hippocampus-Region schließen lässt (Zeyda und Hochgeschwender 2008).

Der SST3 bindet den Liganden SS-14 mit vierfach höherer Affinität als SS-28 (Corness et al. 1993).

SST4

Im Gegensatz zu den anderen SST, gegen welche bereits seit Jahren spezifische monoklonale Antikörper vorliegen und welche dadurch in ihrem Vorkommen und ihrer Wirkweise genauer untersucht werden konnten, ist über den SST4 bislang eher wenig bekannt. Die vorhandenen Erkenntnisse stützen sich dabei auf Untersuchungen der mRNA-Expression und auf Immunfärbungen mit polyklonalen Antikörpern sowie auf Studien an SST4-Knock-out-Mauslinien (Zeyda und Hochgeschwender 2008, Gunther et al. 2018).

Der SST4 moduliert über spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle und einwärts gleichrichtende K⁺-Kanäle kortikale Neurone und retinale Ganglienzellen in der Ratte. Er wirkt unter anderem auch über die Phospholipase A2, welche die Produktion von Arachidonsäure als second-messenger sowie die Aktivierung des MAP-Kinase-Weges vermittelt.

Der SST4 scheint der einzige SST zu sein, welcher über komplexe Regulationsmechanismen die Zellproliferation nicht nur hemmen, sondern diese auch über ein Aktivierungssignal an die Protein-Kinase C (PKC) sowie über die MAP-Kinase-vermittelte Serin-Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT3 stimulieren kann (Theodoropoulou und Stalla 2013, Gunther et al. 2018).

In SST4-Knock-out-Mäusen konnten vermehrt spontane epileptische Anfälle gesehen werden, was auf einen wichtigen Einfluss des SST4 im Hippocampus schließen lässt. Dies stimmt auch mit der Beobachtung einer verminderten Somatostatin-Bindung im hippocampalen CA1-Areal in diesen Mäusen überein (Zeyda und Hochgeschwender 2008).

Durch seine Expression in weiten Teilen des ZNS scheint der SST4 wichtige Funktionen für Gedächtnis, Kognition und Lernverhalten zu erfüllen. Es wurde beobachtet, dass er Auswirkungen auf das Verhalten in verschiedenen Stresssituationen hat und protektiv gegen inflammatorische und hyperalgetische Abläufe und Zustände wirkt. Er wurde zudem auf der Basis von experimentellen Daten als mögliches pharmakologisches Target für die Alzheimer-Krankheit vorgeschlagen (Helyes et al. 2009, Gunther et al. 2018).

Beobachtungen einer schnellen Dissoziation von Rezeptor und Ligand nach der Ligandenbindung, einer anschließenden Internalisierung sowie eines raschen Recyclingprozesses in den mit dem humanen SST4 transfizierten Zellen stehen jenen gegenüber, die in Rattengewebe keinerlei Internalisierung des Rezeptors finden konnten. Es scheint daher zwischen den SST4 verschiedener Säugetier-Spezies Unterschiede im Verhalten und möglicherweise auch in den Signalmechanismen zu geben (Gunther et al. 2018).

In transfizierten HEK293-Zellen zeigte der SST4 sich als Homodimer. Er scheint unter gewissen Bedingungen jedoch auch Heterodimere mit dem SST5 zu bilden, wenn dieser ko-exprimiert vorliegt (Gunther et al. 2018).

SST5

Der SST5 bindet SS-28 als Liganden mit höherer Affinität als SS-14.

Der SST5 übernimmt eine wichtige Kontrollfunktion in der endokrinen Sekretion von Insulin im Pankreas und von GH in der Hypophyse. Man findet ihn ebenso in 62-93% der neoplastischen Gewebe, wie beispielsweise in Hypophysenadenomen und verschiedene Schilddrüsentumoren. Sein Auftreten korreliert hierbei negativ mit dem Entdifferenzierungsgrad und hat eine positive Assoziation mit dem Outcome der Patienten. Eine Überexpression ist jedoch auch mit einer vermehrten vaskulären und neuralen Invasion und somit mit einer erhöhten Tumoraggressivität verknüpft (Gunther et al. 2018).

Durch den SST5 werden sehr verschiedene Signaltransduktionswege, welche zur Hemmung des Zellwachstums führen können, aktiviert. Für seine antiproliferativen Effekte bedient er sich als einziger SST jedoch nicht des PTP-Signalwegs. Er aktiviert unter anderem die Phospholipase C (PLC) und führt darüber zu einer Zunahme der Konzentration an Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP3), was in einer erhöhten zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration resultiert und zur Aktivierung der PKC führt, welche ihrerseits Einfluss auf zahlreiche zelluläre Prozesse inklusive Zellzyklus, Zellüberleben und

Zelltod nimmt. Zudem hemmt der SST5 die lösliche Guanylatcyclase, was in einer verminderten intrazellulären Konzentration an zyklischem Guanosin-Mono-Phosphat (cGMP) sowie in einer Inhibition der MAP-Kinase resultiert. Über eine Inaktivierung der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) supprimiert der SST5 auch das Wachstum von Tumorzellen (Cordelier et al. 2006, Theodoropoulou und Stalla 2013, Isakov 2018).

Nach Bindung des Liganden wird der SST5 β -Arrestin-vermittelt schnell internalisiert, im weiteren Verlauf recycelt und wieder an der Zelloberfläche exprimiert. Er kann in verschiedenen Homodimer/Heterodimer-Kombinationen, auch mit anderen SST gekoppelt, vorliegen und unterstützt dabei unter anderem den SST1 und den SST2 in der Ausübung ihrer Funktion (Gunther et al. 2018).

2.3. Somatostatin-Analoga

Durch seine generell inhibitorische Wirkung auf Hormonsekretionsvorgänge, Zellwachstum und Zellproliferation stellt Somatostatin einen folgerichtigen Kandidaten für die Behandlung von Patienten mit entsprechenden Krankheitsbildern und Beschwerden dar (Chalabi et al. 2014).

Der klinische Einsatz des natürlichen Somatostatins ist aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit sowie seines sehr breiten Wirkspektrums auf die verschiedenen SST-Subtypen limitiert. Aus diesem Grund wurde schon bald nach der Entdeckung und Charakterisierung des Somatostatins und seiner Wirkungen die Synthese von Peptid-Analoga initiiert, welche eine erhöhte metabolische Stabilität und somit eine längere Halbwertszeit und ein spezifischeres Wirkspektrum aufweisen (Scarpignato und Pelosini 2001, Rai et al. 2015, Gunther et al. 2018). Aufgrund der Überexpression von SST in verschiedenen Tumorentitäten werden Somatostatin-Analoga (SSA) mittlerweile als spezifische Therapiemöglichkeit bei Erkrankungen wie beispielsweise der Akromegalie oder bestimmten neuroendokrinen Neoplasien (NEN) eingesetzt, wenn diese einer Komplettresektion nicht oder nicht sofort zugänglich sind. Der Vorteil von SSA gegenüber herkömmlichen Chemotherapeutika besteht insbesondere in den deutlich geringeren Nebenwirkungen, da der anti-neoplastische Effekt nicht über eine allgemeine Zytotoxizität realisiert und die Tumor-Therapie somit deutlich besser vertragen wird (Scarpignato und Pelosini 2001, Rai et al. 2015).

Neben der Einsatzmöglichkeit von SSA in der Pharmakotherapie werden beispielsweise auch ^{68}Ga -gekoppelte SSA im Rahmen der SST-Szintigrafie oder der SST-PET/CT zur diagnostischen Suche nach neuroendokrinen Primärtumoren und Metastasen sowie zum Staging und Re-Staging dieser genutzt. Ebenso steht mittlerweile die SST-basierte Radiorezeptortherapie mit ^{90}Y - oder ^{177}Lu -gekoppelten SSA, wie beispielsweise ^{90}Y -DOTATOC, -DOTANOC oder -DOTATATE, als Behandlungsoption zur Verfügung. Weitere

Forschungsergebnisse in diesem Gebiet sind zu erwarten (Scarpignato und Pelosini 2001, Fani et al. 2017).

2.3.1. Octreotid

Octreotid ist ein zyklisches Oktapeptid. Es gehörte zu den ersten synthetischen SSA-Peptiden mit ausreichender metabolischer Stabilität. Es vermittelt seine Wirkung hauptsächlich über den SST2. Den SST5 bindet Octreotid mit deutlich geringerer Affinität (Chalabi et al. 2014, Lamberts und Hofland 2019).

Seine anti-sekretorischen und anti-proliferativen Effekte werden seit Mitte der 1980er Jahre zur Therapie des Karzinoid-Syndroms, der VIP-assoziierten Diarrhoe, für Glukagonome, Insulinome, Gastrinome sowie zur Behandlung GH-produzierender Tumore genutzt. Außerdem wird Octreotid auch zur initialen Behandlung akuter intestinaler Varizenblutungen eingesetzt.

Einen besonderen Stellenwert nimmt Octreotid seit vielen Jahren in der Therapie der inoperablen Akromegalie ein. Neben einer deutlichen Verbesserung der typischen Symptome wie unter anderem Kopfschmerzen, Parästhesien und Schweißneigung, hat Octreotid bei diesen Patienten einen positiven Einfluss auf die generelle Lebensqualität sowie auf Langzeitfolgen und Komorbiditäten wie Herz-Kreislauf- und Lungen-Erkrankungen. Bei zwei von drei Patienten konnte durch die Behandlung eine Minderung des Tumorumfanges beobachtet werden, welche über den Zeitraum der Therapie durchgehend anhielt. Die (restliche) natürliche Hypophysenfunktion blieb von der Therapie unbeeinträchtigt. Ein Nicht-Ansprechen auf die Therapie ist selten zu beobachten (Scarpignato und Pelosini 2001, Chalabi et al. 2014, Lamberts und Hofland 2019).

Octreotid ist unter dem Handelsnamen Sandostatin® als mittellang- und langwirksame Injektionsform für die subkutane und intramuskuläre Applikation erhältlich. Zu den unerwünschten Arzneimittelwirkungen gehören Übelkeit, abdominale Beschwerden, Flatulenz, Diarrhoe und Malabsorption. In den ersten Behandlungstagen kann zudem eine verminderte Glukosetoleranz beobachtet werden. Diese Nebenwirkungen treten dosisabhängig auf und sistieren spontan nach 7-14 Tagen (Chalabi et al. 2014, Lamberts und Hofland 2019).

Octreotid, gekoppelt an den Positronenstrahler ⁶⁸Gallium, wird im Rahmen einer PET/CT für die Suche insbesondere nach gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren (GEP-NETs) und ihren Metastasen eingesetzt. Die Expression des SST2 in diesen Tumoren wird über diese Methode parallel mitexploriert und kann Einfluss auf die nachfolgende Therapie haben.

Gekoppelt an Beta-Strahler wie $^{90}\text{Yttrium}$ trägt eine Octreotid-Radioliganden-Therapie nachweislich zu einer Tumormassereduktion und einem verbesserten Überleben bei (Fani et al. 2017, Lamberts und Hofland 2019).

2.3.2. Pasireotid

Pasireotid ist ein Cyclohexapeptid. Seine Wirkung entfaltet es in abnehmender Affinität über den SST5, den SST2, den SST3 und den SST1, wobei die Affinität zum SST5 40mal höher ist als die von Octreotid.

Pasireotid ist unter dem Handelsnamen Signifor® auf dem Markt. Es besitzt eine Plasmahalbwertszeit von 12 Stunden bzw. in seiner langwirksamen Form von 16 Tagen.

Pasireotid wird seit 2009 in Europa und seit 2012 in den USA für die Behandlung des nicht-operablen Cushing-Syndroms eingesetzt. Seit 2014 ist es zudem als Zweitlinien-Therapie für Akromegalie-Patienten zugelassen, welche einer Operation nicht zugänglich sind. Mögliche weitere Einsatzgebiete von Pasireotid sind Gegenstand aktueller Forschung.

Pasireotid weist ein breites Spektrum an häufig anzutreffenden Nebenwirkungen auf. Dazu gehören unter anderem grippeähnliche Symptome, Fatigue, Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, Diarrhö, eine verminderte Gallenblasenkontraktilität, mit der Folge einer vermehrten Gallensteinbildung, sowie erhöhte Bilirubin-Serumwerte. Ebenso kann bei etwa 30% der Patienten eine Erhöhung der Enzyme ALT und AST unter Pasireotid-Therapie beobachtet werden, weswegen die Leberwerte regelmäßig kontrolliert werden sollten. Im Vergleich zu Octreotid neigen Patienten unter Pasireotid-Therapie häufiger zu Hyperglykämien und können im Verlauf der Therapie einen Diabetes entwickeln (2012, Sun und Coy 2016, Sawicka-Gutaj et al. 2018).

Andere SSA

Lanreotid (Somatuline LAR®, Somatuline Autogel®) hat ein ähnliches Wirkspektrum wie Octreotid, mit einer hohen Bindungsaffinität für den SST2 und einer geringeren für den SST5. Es wird ebenfalls für die Behandlung der Akromegalie und von NETs eingesetzt. Es scheint, Studien zufolge, ebenso als mögliche Behandlungsoption für polyzystische Nierenerkrankungen, medulläre Schilddrüsenkarzinome und TSH-sezernierenden Adenome in Frage zu kommen (Chalabi et al. 2014, Sun und Coy 2016).

Vapreotid (Octastatin®, Sanvar®), ebenso wie Octreotid ein zyklisches Oktapeptid, wird für die Behandlung akuter Ösophagus-Varizen-Blutungen in Kombination mit vasokonstriktiven Medikamenten eingesetzt. Die genaue Wirkweise ist dabei noch nicht verstanden; unter anderem mindert es die Durchblutung des Splanchnikus-Gebietes. Nebenwirkungen treten vor

allem in Form von gastrointestinalen Symptomen wie Diarrhöen, Übelkeit und abdominellem Unwohlsein auf (Fortune et al. 2009).

Veldoreotid, auch unter dem Namen DG3173 oder Somatoprim beschrieben, ist ein Heptapeptid. Sowohl die Aminosäuresequenz als auch das zyklische Rückgrat des SSA sind neuartig aufgebaut. Neben einer hohen Affinität für den SST2 und den SST5 besitzt Veldoreotid als einziges SSA eine ebenfalls gute Bindungsaffinität für den SST4. In Studien an humanen somatotrophen Adenomzellkulturen wurde Veldoreotid im Vergleich mit Octreotid getestet und konnte vielversprechende Ergebnisse liefern: Zum einen hat Veldoreotid eine 10.000fach höhere Inhibitionswirkung auf die GH-Sekretion als auf die Insulin-Ausschüttung, was den Vorteil eines deutlich verminderten Hyperglykämie-Risikos in der Behandlung mit sich brächte. Zum anderen inhibierte Veldoreotid die GH-Ausschüttung auch in einigen Zellkulturen, welche nicht auf eine Behandlung mit Octreotid ansprachen. Veldoreotid könnte also eine mögliche Therapiealternative bei Patienten mit Octreotid-unsensiblen Adenomen darstellen. Weitere Studien und Ergebnisse müssen noch abgewartet werden (Koch 2011, Plockinger et al. 2012).

2.4. Antikörper

Antikörper, auch als Immunglobuline bezeichnet, gehören zu den sogenannten schweren Plasma-Glykoproteinen. Sie spielen für die Abläufe des Immunsystems eine wichtige Rolle und dienen insbesondere der Antigen-Erkennung, der Neutralisation und der Eliminierung körperfremder Organismen und Pathogene (Wootla et al. 2014, Ma und O'Kennedy 2015).

Antikörper werden von B-Lymphozyten produziert. Diese entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und durchlaufen in den verschiedenen Stadien ihrer Reifung die Milz und sekundäre lymphatische Organe. Die Antikörper selbst liegen sowohl membrangebunden auf den Lymphozyten wie auch sezerniert und ungebunden im Serum und anderen Körperflüssigkeiten vor (Kamradt und Ferrari-Kuhne 2011, Eibel et al. 2014).

Antikörper besitzen eine Y-ähnliche Form und bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, welche über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Jede leichte Kette besteht aus einer konstanten, einer variablen und einer joining-Region; jeweils auch als C-, V- und J-Region abgekürzt. Jede schwere Kette besitzt neben diesen C-, V- und J-Domänen noch eine Diversitäts-Region, die D-Region, und verfügt somit über 4 Regionen.

Antikörper werden durch eine zufällige Rekombination einer Vielzahl verschiedener Gene für die einzelnen Regionen gebildet; ein Vorgang, der auch als somatische Rekombination bezeichnet wird. Das Zusammenfügen der verschiedenen Gen-Elemente unterliegt einer Ungenauigkeit und es können dabei außerdem sogenannte N-Regionen zusätzlich eingebaut werden. Durch diese Zufallskombination von Gen-Elementen wird eine extrem große Diversität

von Antikörpern mit einer jeweils hochspezifischen Bindungsaffinität für ein bestimmtes Antigen gebildet; es entsteht ein nahezu unbegrenztes Repertoire an Antikörpern für alle möglichen Pathogene und Epitope (Kamradt und Ferrari-Kuhne 2011, Ma und O'Kennedy 2015).

Bindet ein Antigen einen membranständigen Antikörper auf einem B-Lymphozyten, werden Signale zur Zellproliferation und zur Zytokinproduktion und -ausschüttung induziert. Durch die Interaktion mit T-Helferzell-Rezeptoren, welche durch Antigen-präsentierende Zellen aktiviert wurden, differenzieren die B-Lymphozyten sich zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen und B-Gedächtniszellen. Die Zytokine aktivieren zudem andere Zellen des Immunsystems, welche sich an der Erkennung und Bekämpfung des Antigens beteiligen (Kamradt und Ferrari-Kuhne 2011, Hutloff 2016).

Im Verlauf der Immunantwort kommt es in den Tochterzellen des B-Lymphozyten zur sogenannten somatischen Hypermutation. Die somatische Hypermutation wird durch Mutationen in den Genen, welche für den variablen Teil des Antikörpers codieren, ausgelöst. Die Tochterzellen exprimieren folglich mutierte Antikörper, von denen sich jene durchsetzen und die stärksten Proliferationsreize induzieren, welche das Antigen mit noch höherer Affinität binden können als der ursprüngliche Antikörper. Die Antikörper, hingegen, welche durch die Mutation eine verringerte bis aufgehobene Affinität für das Antigen besitzen, geben nur schwache bis keine Proliferationsreize an ihre B-Zelle weiter (Kamradt und Ferrari-Kuhne 2011).

Neben dem Fragment-antigen-binding-Teil, kurz Fab-Teil, verfügt der Antikörper über ein konstantes Fragment, den Fc-Teil. Dieser wird aus den konstanten Regionen der schweren Ketten gebildet. Entsprechend seiner Struktur werden die Antikörper in 5 Klassen eingeteilt: IgG, IgM, IgA, IgE und IgD. Nach Bindung eines Antigens an einen Antikörper vermittelt der Fc-Teil über die Kopplung an spezifische membranständige Rezeptoren auf verschiedenen Immunzellen die Effektorfunktion der jeweiligen Antikörper-Klasse.

Typischerweise besitzt das erste exprimierte Immunglobulin eines B-Lymphozyten als schwere Kette die sogenannte μ -Kette und gehört somit zu den IgM. Im Laufe einer Immunantwort wird am Fc-Teil der Klassenwechsel vollzogen: Der Isotyp des Antikörpers ändert sich von IgM zu IgG, IgE oder IgA, ohne, dass der Fab-Teil und somit die Affinität für das Antigen verändert wird. Zellspezifische Effektorfunktionen im Rahmen der Immunantwort auf ein Antigen können über diesen Klassenwechsel angepasst und optimiert werden.

IgM, als primär exprimierter Antikörper-Isotyp, erkennt insbesondere bakterielle Epitope. Frei vorliegendes IgM aktiviert außerdem über seinen Fc-Teil die klassische Komplementkaskade als Abwehrmechanismus insbesondere gegen bekapselte Bakterien. Die Bindung von Antigen-gebundenem IgE an Mastzellen bewirkt unter anderem die bekannte

Histaminausschüttung. Antigen-aktiviertes IgG induziert durch Bindung an Makrophagen auch eine rezeptorvermittelte Phagozytose des Antigens und durch Bindung an Natürliche Killerzellen die Zytolyse der Antigen-beladenen Zelle (Kamradt und Ferrari-Kuhne 2011, Eibel et al. 2014).

Einen großen Vorteil des adaptiven Immunsystems und der Antikörperbildung stellt die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses dar. Nach erfolgreich abgewehrter Infektion wandern zu einer Antikörper-bildende Plasmazellen ins Knochenmark. Dort produzieren sie, teilweise über Jahrzehnte, weiterhin Antikörper gegen das bekämpfte Antigen. B-Gedächtniszellen überleben zum anderen jedoch auch in verschiedenen Geweben, in welchen sie Kontakt mit dem Antigen aufnehmen könnten. Im Falle einer erneuten Antigen-Erkennung bei Re-Infektion kann die Immunantwort deutlich schneller, gezielter und somit effektiver erfolgen.

Auf diesem Prinzip der Immungedächtnisbildung basiert die Entdeckung sowie der Erfolg der meisten Impfstoffe (Kamradt und Ferrari-Kuhne 2011, Eibel et al. 2014, Akkaya et al. 2020).

Dem Zufallsprinzip ihres Zusammenbaus geschuldet, entstehen beim Vorgang der Rekombination nicht nur immunologisch funktionale und pathogen-gerichtete Antikörper, sondern auch nutzlose sowie auto-reaktive und somit potentiell toxische Antikörper, welche dem eigenen Körper schwere Schäden zufügen können. Diesem Problem wird über folgende Mechanismen der B-Zell-Toleranz begegnet: Zum einen wird bei B-Zellen, welche bereits in ihrer unreifen Form im Knochenmark ein Antigen erkennen, die Apoptose eingeleitet. Zum anderen spielt für die B-Zell-Toleranz die T-Zell-Toleranz eine Schlüsselrolle, da eine B-Zelle nur mit Hilfe einer T-Zelle eine reife Antikörperantwort auslösen kann und ohne diese Hilfestellung keine große Gefahr darstellt.

Die immunologische T-Zell-Toleranz wird durch positive und negative Selektionsvorgänge im Thymus gewährleistet: Im ersten Schritt der positiven Selektion müssen die unreifen T-Zellen ein Selbst-MHC erkennen und mit diesem interagieren, denn nur eine Kombination von fremdem Antigen mit einem Antigen-präsentierenden MHC-Molekül des Körpers führt zu einer korrekten immunologischen Antwort der T-Zellen. Interagiert die unreife T-Zelle nicht mit den körpereigenen MHC-Molekülen, erhält sie keine Überlebenssignale der Antigen-präsentierenden Thymuszelle und wird apoptotisch. Im zweiten Schritt der negativen Selektion werden hingegen jene T-Zellen in die Apoptose getrieben, welche eine zu hohe Affinität für körpereigene Peptide und Antigene zeigen und somit eine autoreaktive Gefahr für den Körper darstellen (Kamradt und Ferrari-Kuhne 2011).

Aufgrund ihrer Eigenschaft der hochspezifischen Bindungsaffinität für ein bestimmtes Epitop sind Antikörper seit Jahren in den Fokus diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten gerückt. Ihre fortschreitend spezifizierte Entwicklung und ihr Einsatz haben die Erforschung und die Entdeckung, ebenso wie die Behandlung zahlreicher Erkrankungen, nachhaltig geprägt und verbessert (Lipman et al. 2005).

2.5. Die Herstellung monoklonaler Antikörper

Die meisten körperfremden Antigene besitzen eine komplexe Struktur. Sie exprimieren somit auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl verschiedener Epitope, die wiederum von einer Vielzahl verschiedener spezifischer Antikörper erkannt werden. Diese Antigen-gebundenen Antikörper aktivieren parallel zueinander ihre B-Zellen und senden Proliferations- und Differenzierungssignale aus. Als Resultat erfolgt im Körper die Immunantwort auf das eingedrungene Antigen „polyklonal“, also parallel über mehrere B-Zell-Linien sowie ihre verschiedenen spezifischen Antikörper (Lipman et al. 2005).

Werden im Gegensatz dazu nur die Antikörper eines B-Zell-Klons generiert, bezeichnet man dies als „monoklonal“. Auf die Produktion monoklonaler Antikörper wurde man erstmals bei Patienten mit Multiplem Myelom aufmerksam, einer Krankheit, bei welcher entartete Plasma-Zellen hohe Mengen an monoklonalen Antikörpern produzieren.

Die Möglichkeiten, welche eine Produktion monoklonaler Antikörper (mAB) mit einem bestimmten Ziel-Epitop in der Forschung, weiterreichend auch in der Diagnostik und sogar in einer möglichen Therapie bieten würden, führten zu zahlreichen Ansätzen und Versuchen ihrer gezielten Generierung. Eine erste Beschreibung der biotechnologischen Herstellung spezifischer mAbs mithilfe von Hybridom-Zellen wurde schließlich 1975 von Köhler und Milstein veröffentlicht. Mit dieser Methode war es nun erstmals möglich, eine unbegrenzte Menge gleicher und für ein bestimmtes Target hochspezifischer Antikörper herzustellen. Beide Wissenschaftler erhielten für die Entwicklung dieser Technik im Jahre 1984 den Nobelpreis für Physiologie (Lipman et al. 2005, Zhang 2012, Hanack et al. 2016, Shepard et al. 2017).

Ziel der Technik ist es, *in vitro* einen unsterblichen B-Lymphozyten mit der Produktion eines spezifischen Antikörpers entstehen zu lassen.

Im ersten Schritt wird das Versuchstier, in den meisten Fällen eine Maus, mit einem präparierten Antigen, in diesem Fall auch als Immunogen bezeichnet, immunisiert. Typischerweise verwendete Immunogene sind Proteine, Zellen, synthetische Peptide sowie kurze Peptide, welche an ein Trägerprotein gekoppelt sind. Proteine werden dem Tier subkutan, Zellen intraperitoneal verabreicht. Meist ist das verabreichte Immunogen mit einem Adjuvans verknüpft, welches als unspezifischer Verstärker agiert und die polyklonale Immunantwort verstärkt. Der Titer der Antikörper im Blut, welche gegen das gewünschte

Antigen gerichtet sind, kann mittels ELISA-Assays kontrolliert werden. Zudem wird durch die Adjuvans-induzierte Boosterung der Immunantwort der Klassenwechsel gefördert und die somatische Hypermutation angeregt, welche eine verbesserte Affinität des Fab-Teils für das Immunogen bewirken kann. Es können mehrere Immunisierungen mit einigen Tagen Abstand am Tier vorgenommen werden, bis der gewünschte Antikörpertiter erreicht wird.

Drei Tage nach der letzten Immunisierung wird das Tier protokollgerecht getötet. Unter sterilen Bedingungen wird die Milz entnommen und das Milzgewebe und damit auch die darin enthaltenen Lymphozyten in einem RPMI-1640-Zellmedium aufbereitet (Nelson et al. 2000, Zhang 2012).

Der zweite Schritt besteht aus dem eigentlichen Hybridisierungsvorgang, also der Fusion eines B-Lymphozyten mit einer histokompatiblen Myelomzelle. Die dafür eingesetzten Myelomzellreihen sind vorselektiert und auf das Merkmal eines HGPRT-Enzymmangels hin untersucht. Dieser Enzymmangel bewirkt, dass die überlebenswichtige Purin-Biosynthese in der Myelom-Zelle nur de novo und nicht alternativ über den sogenannten salvage-pathway stattfinden kann, welcher auf die HGPRT angewiesen ist. Dieses Charakteristikum dient dem späteren Selektionsprozess.

Die vorselektierten Myelomzellen und die Milzzellen werden in einer Fusionslösung, beispielsweise einer Polyethylen-Glycol-Lösung, vermischt. Mehrere Zwischenschritte wie Zentrifugationen und Temperaturänderungen des Mediums sollen die Fusion der Zellen erleichtern und fördern. Als nächstes folgt die Eliminierung nicht-fusionierter Zellen, insbesondere nicht-fusionierter Myelomzellen. Diese besitzen andernfalls die Möglichkeit, durch ungebremstes Wachstum jegliche andere Zellreihe zu verdrängen. Hierfür werden die zentrifugierten Zellen in ein Selektionsmedium, das sogenannte HAT-Medium, gegeben. Das HAT-Medium beinhaltet Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin. Besondere Bedeutung kommt in diesem Medium dem Aminopterin zu, welches die de-novo-Purinsynthese blockiert und den Myelomzellen somit diesen lebenswichtigen Prozess unmöglich macht. Als Resultat sterben die Myelomzellen ab, während die fusionierten Hybridomzellen durch die Eigenschaft der Milzzelle, mit dem Enzym HPGRT auf den salvage-pathway für die Purinsynthese zurückgreifen zu können, von der de-novo-Synthese und deren Blockierung durch Aminopterin unabhängig sind. Die Hybridom-Zellen überleben und gedeihen im Nährmedium.

Die verbliebenen nicht-fusionierten Lymphozyten und andere Milzzellen sterben natürlicherweise nach wenigen Tagen in der Zellkultur ab.

Nach 20 bis 30 Tagen ist der Selektionsprozess abgeschlossen und die Hybridom-Zellen können in ein reines HT-Medium, ohne Aminopterin, transferiert werden (Nelson et al. 2000, Zhang 2012).

Im dritten Schritt sollen jene Hybridomzellen identifiziert und herausgesucht werden, welche für das gewünschte Target Antikörper mit höchstmöglicher Spezifität produzieren.

Mittels ELISA oder anderen immunzytochemischen Screeningmethoden werden die Antikörper der Hybridomzellen in einem ersten Screening-Prozess auf ihre allgemeinen Eigenschaften und ihre Spezifität hin getestet. Hybridomzellen, welche unspezifische Antikörper produzieren, werden direkt eliminiert.

Weitere Screenings mittels ELISA, Durchflusszytometrie oder Immunhistochemie schließen sich an und erlauben eine erste Einteilung der Hybridomzellen und ihrer Antikörper nach deren Antigen-Bindungsaffinität und der Spezifität (Nelson et al. 2000, Zhang 2012).

Im vierten Schritt erfolgt eine detailliertere Charakterisierung einzelner Hybridomzellen hinsichtlich der Reaktivität, Spezifität und Kreuzreaktivität ihrer monoklonalen Antikörper.

Um die Voraussetzung einer monoklonalen Subpopulation mit einem monospezifischen Antikörper zu ermöglichen und Mischkulturen zu vermeiden, muss vorerst der zeitaufwendige Schritt des sogenannten „Hybridom-Subklonings“ erfolgen: Hierfür werden aus der Dilutions-Lösung mit den enthaltenen Hybridom-Zellkulturen mikroskopisch einzellige Kolonien ausgewählt und in ein Nährmedium transferiert. Dieses Nährmedium kann unter anderem Peritonealexsudat, Fibroblasten oder andere Ergänzungsmittel enthalten, um optimale Kultivierungsbedingungen für die Subklone zu schaffen. Die Inkubation erfolgt zudem unter bestimmten Temperaturen und Gasgemischen, welche möglichst konstant gehalten werden sollten. Das Wachstum der Subklone wird mikroskopisch kontrolliert.

Aus den wachsenden Zellkulturen werden anschließend regelmäßig Proben entnommen und mit meist verschiedenen Screeningverfahren auf die Reaktivität und Spezifität ihres produzierten Antikörpers getestet. Die Anwendung verschiedener Verfahren dient dabei dem Vermeiden technikbedingter Fehler mit der Folge falsch-positiver Ergebnisse.

Je nach Ergebnis werden Subklon-Kulturen für eine Antikörperproduktion ausgewählt und in größerem Stil angezüchtet. Hierbei erfolgt unter anderem auch die Isotypisierung des produzierten Antikörpers, um die schweren Ketten und die damit verbundenen Effektorfunktionen besser charakterisieren zu können. In den meisten Fällen handelt es sich bei dem produzierten Antikörper um IgG.

Einige Hybridom-Subklonpopulationen werden außerdem für die Möglichkeit einer späteren Erforschung kryokonserviert. Temperaturen unter -80°C ermöglichen lange Lagerungszeiten, ohne dabei die Eigenschaften der Hybridomzellen zu beeinflussen (Nelson et al. 2000, Zhang 2012).

Der gesamte Vorgang der Hybridomzell-Herstellung und der Generierung spezifischer monoklonaler Antikörper ist in der folgenden Abbildung noch einmal dargestellt (Zhang 2012).

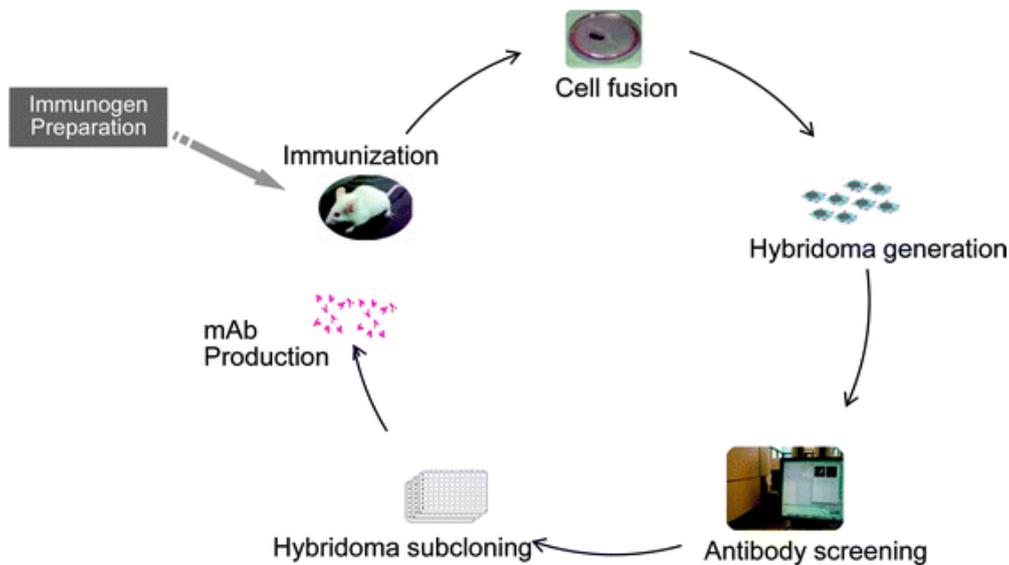


Abbildung 2: Hybridom-Technologie für die Generierung monoklonaler Antikörper (Zhang 2012).

Die Hybridom-Zell-Technologie stellte einen Durchbruch für die molekulare Wissenschaft und die molekulare Medizin dar. Die weitere Entwicklung von spezifischen mAbs und ihr Einsatz in zahlreichen Gebieten der Wissenschaft hat die Forschung, das Verständnis und insbesondere die biopharmazeutische Entwicklung nachhaltig geprägt und revolutioniert. Durch ihre hochspezifische Bindungsaffinität wirken die monoklonalen Antikörper über ihre Effektorfunktionen zielgerichtet an ausgewählten Strukturen. Bei therapeutischem Einsatz zeichnen sie sich durch eine oft deutlich verminderte Toxizität im Vergleich zu vielen konventionellen Behandlungsstrategien aus.

Bereits 1986 erhielt Orthoclone OKT3 als erster mAb eine Zulassung für die Prävention der Organ-Abstoßung nach Nieren-Transplantation. Mittlerweile werden Antikörper für die Behandlung von mehreren Dutzend Krankheiten eingesetzt, insbesondere bei Tumor- und Autoimmunerkrankungen sowie anderen chronisch-entzündlichen Krankheiten.

Neben den herkömmlichen murinen mAbs, welche aus Mäusen generiert werden, stehen heutzutage oftmals auch chimäre oder humane Antikörper zur Verfügung. Diese bringen die Vorteile einer verbesserten Verträglichkeit, einer erhöhten Wirkung und einer verlängerten Plasma-Halbwertszeit mit sich. Ihre Herstellung erfolgt in transgenen Mäusen oder durch die Verwendung von Phagen-Antikörper-Bibliotheken (Wootla et al. 2014, Ecker et al. 2015, Shepard et al. 2017).

3. Zielstellung

Im Gegensatz zu den anderen Somatostatin-Rezeptoren, gegen welche schon seit einigen Jahren spezifische monoklonale Antikörper vorliegen und welche aus diesem Grund bereits gut charakterisiert und in ihrer Verteilung und Signaltransduktion weitreichend erforscht sind, ist über die Expression des SST4 bislang wenig bekannt. Diese wenigen Erkenntnisse stützen sich auf Ergebnisse, die mit Knock-out-Mauslinien erzeugt wurden, auf mRNA-Analysen sowie auf Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern, die jedoch alle nur eine eher geringe Spezifität aufweisen.

In Zusammenarbeit mit ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) konnte vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena kürzlich ein vielversprechender monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen den SST4 generiert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, einen Beitrag zur Charakterisierung des neu entwickelten monoklonalen Kaninchen-Antikörpers 7H49L61 zu leisten und ihn für den Nachweis des SST4 in verschiedenen Geweben einzusetzen.

Im ersten Teil der Arbeit sollten verschiedene humane Normalgewebe mittels immunhistochemischer Färbungen auf eine Expression des Rezeptors hin untersucht werden. Zur weiteren Spezifitätskontrolle sollten in diesem Zusammenhang auch Positivkontrollen und Peptidneutralisationen mit dem Antikörper durchgeführt werden.

Anschließend sollten in einem zweiten und dritten Teil Präparate von 35 verschiedenen menschlichen Tumorentitäten sowie eine große Serie an bronchopulmonalen und gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien immunhistochemisch gefärbt und auf eine Expression des SST4 hin analysiert werden. Die Tumorschnitte sollten hierbei mit Hilfe des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegener bewertet werden, welcher Werte von 0 bis 12 umfassen kann und in welchen sowohl die Färbeintensität der angefärbten Tumoreareale als auch der Prozentsatz der gefärbten Zellen einfließen. Das jeweilige Ausmaß der SST4-Expression in den einzelnen neuroendokrinen Tumoren sollten anschließend mit den klinischen Daten der entsprechenden Patienten auf eventuelle Zusammenhänge hin statistisch untersucht werden.

Insgesamt sollte mit dieser Arbeit eine erste ausführliche Einschätzung über das Vorkommen des SST4 im gesunden menschlichen Gewebe, in verschiedenen menschlichen Tumoren und insbesondere in den neuroendokrinen Tumoren gegeben werden. Das Auftreten und Verhalten des SST4 sollte mit bisherigen Literaturangaben sowie mit dem Vorkommen der anderen SST-Subtypen verglichen und beurteilt werden. Diese erste generelle Einschätzung der SST4-Expression in den verschiedenen normalen und neoplastischen Geweben könnte als eine gute Grundlage für weitere Forschungen zu diesem Rezeptor dienen.

4. Material und Methoden

4.1. Gewebeprobe

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 62 Normalgewebspräparate untersucht, welche vom Labor für Pathologie und Zytologie der Zentralklinik Bad Berka sowie den Waldkliniken Eisenberg zur Verfügung gestellt worden waren. Die untersuchten Normalgewebe umfassten folgende Organe und Gewebe (n): Cortex (12), Trigeminusganglien (2), Hypophyse (3), Plazenta (11), Herz (2), Lymphknoten (5), Bronchus (1), Lunge (1), Leber (4), Milz (1), Pankreas (5), Niere (3), Nebenniere (2), Duodenum (3), Colon transversum (2) und Knochenstanzen vom Caput femoris (5).

Ergänzend wurden außerdem einige Normalgewebe ausgewertet, die neben dem neoplastischen Gewebe in den Tumorpräparaten gefunden werden konnten. Dazu zählten Anschnitte des Fettgewebes, Blutgefäßanschnitte, Anschnitte der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, des Magens, der Mamma, des Ovars, der Tuba uterina, der Zervix, der Prostata sowie des Hodens.

Die 246 Tumorgewebe, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollten, wurden von der Zentralklinik Bad Berka sowie der Universitätsklinik Greifswald bereitgestellt. Sie umfassten 9 Glioblastome, 2 Hypophysenadenome, 12 Adenokarzinome der Lunge, 10 Plattenepithelkarzinome der Lunge, 9 kleinzellige Lungenkarzinome, 10 Nebenschilddrüsenadenome, 10 follikuläre Schilddrüsenkarzinome, 11 papilläre Schilddrüsenkarzinome, 7 medulläre Schilddrüsenkarzinome, 8 anaplastische Schilddrüsenkarzinome, 11 Pankreaskarzinome, 9 cholangiozelluläre Karzinome, 9 hepatozelluläre Karzinome, 7 Phäochromozytome, 8 klarzellige Nierenkarzinome, 7 Harnblasenkarzinome, 9 Magenkarzinome, 9 Kolon-Karzinome, 10 Gastrointestinale Stromatumore (GIST), 9 Mammakarzinome, 9 Ovarialkarzinome, 10 Endometriumkarzinome, 9 Zervixkarzinome, 12 Prostatakzinome, 12 Hodentumore, 12 Lymphome und 5 Maligne Melanome.

Zudem konnten dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie für die vorliegende Arbeit 769 Präparate von 295 verschiedenen neuroendokrinen Neoplasien durch die Zentralklinik Bad Berka bereitgestellt werden, bei welchen es sich um Schnitte von 172 gastroenteropankreatischen, 97 bronchopulmonalen und 5 sonstigen NEN handelte.

Bei den Proben handelte es sich um Schnellschnitte, Biopsien, Tumorresektate und Lymphknotenanschnitte. Die Präparate waren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Von den Blöcken wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena mittels eines Rotationsmikroskops 4 µm dicke Schnitte angefertigt und diese auf Adhäsionsobjektträger aufgebracht.

Votum der Ethikkommission

Für die Verwendung der humanen Gewebeschnitte liegt ein befürwortendes Votum der zuständigen Ethikkommission der Landesärztekammer Thüringen vor.

Geräte und Materialien zu Probenaufbereitung

Materialien zur Herstellung der Gewebeschnitte

- Objektträger SuperFrost® plus ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Geräte zur Herstellung der Gewebeschnitte

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

4.2. Immunhistochemie

4.2.1. Materialien und Gerätschaften für die Immunhistochemie

Substanzen und Chemikalien

- 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) BioGenex Laboratories, San Ramon, CA, USA
- Ammoniak-Lösung 25% Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Citronensäure-Monohydrat Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- DePeX Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Dinatriumhydrogenphosphat Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
-Dihydrat
- 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
- Kaliumdihydrogenphosphat 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

- 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 Leica, Wetzlar, Deutschland
- Mikrowelle MW802 Exquisit, Kaarst, Deutschland
- pH-Meter pH 211 Hanna Instruments, Kehl, Deutschland
- Shandon CoverplatesTM ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
- Shandon Sequenza®-Färbesystem ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA

Lösungen und Puffer

Citratpuffer-Stammlösung A (0,1 M)

- Zitronensäure 21,01 g
- Aqua bidest. ad 1000 ml

Citratpuffer-Stammlösung B (0,1 M)

- Natriumcitrat-Monohydrat 29,41 g
- Aqua bidest. ad 1000 ml

Citratpuffer (0,1 M, pH=6,0)

- Aqua bidest. 900 ml
- Stammlösung A 18 ml
- Stammlösung B 82 ml

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, pH= 7,4)

- NaCl 8,18 g
- Na₂HPO₄ 1,77 g x 2 H₂O
- KCl 0,2 g
- KH₂PO₄ 0,24 g
- Aqua bidest. ad 1 l

PBS/1% RSA (Rinderserumalbumin)

- PBS 495 ml
- Rinderserumalbumin 5 g

0,3 % Wasserstoffperoxid-Methanol-Lösung

- Methanol 600 ml
- Wasserstoffperoxid 30% 6 ml

AEC: Färbelösung (3-Amino-9-Ethylcarbazol)

- Aqua bidest. 8 ml
- Acetat-Puffer 2 ml
- Aminoethylcarbazol 4 Tropfen

Blockierungslösung

- PBS/1% RSA 10 ml
- Ziegenserum 150 µl

Sekundär-Antikörper

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

Avidin-Biotin-Enzym-Komplex

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

Ammoniakwasser

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

Mowiol

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

Antikörper

Der Antikörper 7H49L61 wurde vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie in Jena in Zusammenarbeit mit ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) entwickelt. Es handelt sich um einen monoklonalen Kaninchen-IgG-Antikörper. Da die meisten kommerziell erhältlichen Antikörper murinen Ursprungs sind, bringt der Kaninchen-Antikörper den Vorteil mit sich, dass man Doppelfärbungen mit unterschiedlichen Sekundärantikörpern durchführen kann und somit keine Kreuzreaktion befürchten muss.

4.2.2. Prinzip der Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie werden bestimmte Proteine und andere Zielstrukturen mithilfe von Antikörpern sichtbar gemacht. In der vorliegenden Arbeit wurde hierfür die ABC-Methode verwendet, welche sich die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze macht. Bei dem verwendeten Streptavidin handelt es sich um ein gentechnisch reineres Produkt als das ursprüngliche Avidin. Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin.

Mit einem Primärantikörper wird das gesuchte Antigen spezifisch erkannt und der Antikörper an dieses gebunden. Über den Fc-Teil des Primärantikörpers wird die ebenfalls spezifische Bindung eines biotinylierten Zweitantikörpers realisiert. Streptavidin, gekoppelt an eine Peroxidase, wird hinzugegeben und bindet an die Biotinreste der Sekundärantikörper. Im nächsten Schritt wird das Chromogen 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) hinzugefügt. Dieses wird von der Peroxidase umgesetzt, was in einer Rotfärbung des Farbstoffes resultiert. Dieser Farbumschlag signalisiert das Vorhandensein des gesuchten Antigens im Präparat.

In der folgenden Abbildung ist die ABC-Methode schematisch dargestellt:

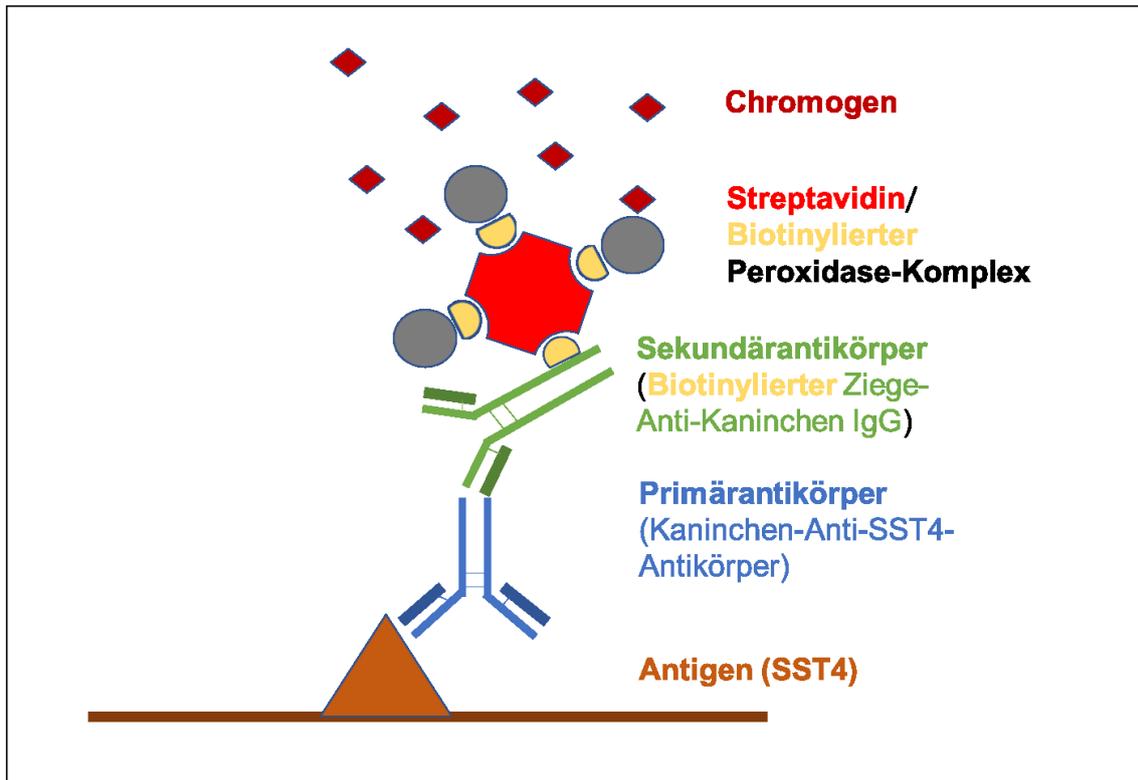


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Immunhistochemie mittels ABC-Methode.

Für eine bessere Orientierung im Präparat kann anschließend, wie auch im folgenden Fall, eine Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin durchgeführt werden.

4.2.3. Durchführung der immunhistochemischen Färbung der Paraffinschnitte

Entparaffinieren der Schnitte

Um eine Immunfärbung durchführbar zu machen, wurden die Präparate im ersten Schritt entparaffiniert und rehydriert. Hierfür wurden die Schnitte drei Mal für jeweils 20 Minuten in Xylol eingelegt. Um anschließend das Xylol zu entfernen, wurden die Präparate drei Mal für je 20 Minuten mit 100%igem Ethanol inkubiert.

Blockierung der endogenen Peroxidase

Die spätere Umsetzung des Chromogens sollte über eine exogen zugeführte Meerrettich-Peroxidase erfolgen. Um unspezifische Färbungen zu verhindern, musste deshalb im nächsten Schritt die in einigen Zellen vorliegende endogene Peroxidase in den Präparaten blockiert werden. Hierfür wurden die Präparate für 45 Minuten in 0,3%igem H_2O_2 in Methanol inkubiert. Zur anschließenden Rehydrierung wurden die Schnitte für jeweils zwei Minuten in eine absteigenden Alkoholreihe (95%, 95%, 85%, 70%) gestellt und dann in Aqua bidest. überführt.

Antigendemaskierung

Die Fixierung im Formalin bewirkt über die Ausbildung von Aldehyd-Brücken eine Quervernetzung zwischen den Carboxylgruppen und den Aminogruppen von Proteinen in den Geweben. Dies kann zu einer Veränderung der dreidimensionalen Struktur der Proteine führen und als Folge zu einer Verminderung der Antigenität des Präparates, woraus eine reduzierte Antikörperbindung und somit eine schlechtere Färbung resultieren würde.

Zur Demaskierung der Antigene wurden die Gewebsschnitte deshalb in mit einem Citratpuffer (0,01 M, pH=6,0) befüllten Küvetten für jeweils acht und zweimal vier Minuten in der Mikrowelle gekocht. Zwischen den einzelnen Kochvorgängen wurden die Präparate jeweils für vier Minuten und nach dem letzten Kochvorgang für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und abschließend in Aqua bidest. transferiert.

pH-Pufferung und das Einsortieren der Proben in das Sequenza®-Färbesystem

Um störende Hintergrundfärbungen zu vermeiden, wurden die Proben im nächsten Schritt in einer Phosphat-Pufferlösung (PBS) mit 1% Rinderserumalbumin (RSA), pH=7,4, für fünf Minuten inkubiert. Dadurch wurden die Ladungen im Präparat abgesättigt und unspezifischen Antikörperbindungen vorgebeugt.

Die Proben wurden dann aus ihren Küvetten entnommen und mittels spezieller Klammern in das Sequenza®-Färbesystem eingespannt. Dadurch entstand ein schmaler Spalt zwischen Objektträger und Färbesystem, welcher die zugeführten Antikörperlösungen mit Kapillarkraft hielt. Somit wird die Voraussetzung einer ausreichenden Kontaktzeit für eine adäquate Reaktion geschaffen. Zur Kontrolle der korrekten Positionierung der Objektträger im System wurden die Objektträger anschließend mit PBS/RSA (1%) gespült.

Antikörperbindung und Färbung

Vor der eigentlichen Färbungsreaktion wurden die Proben für 20 Minuten mit normalem Ziegen-Serum aus dem VECTASTAIN® Elite® ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA, inkubiert. Dadurch wurden unspezifische Bindungen blockiert und störende Hintergrundfärbungen vermieden. Es wurde Ziegen-Serum gewählt, da der im Kit enthaltene Sekundärantikörper ein biotinylierter Ziegenantikörper war.

Nach anschließender Zugabe des Primärantikörpers 7H49L61 wurden die Proben für mindestens 12 Stunden über Nacht bei 4°C inkubiert, um optimale Voraussetzungen für eine Bindungsreaktion zwischen dem Primärantikörper und dem gesuchten Antigen zu schaffen. Am nächsten Tag wurden die Proben zweimal mit PBS/RSA (1%) gewaschen, um alle nicht fest gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Zugabe des biotinylierten

Sekundärantikörpers, bei dem es sich um einen biotinylierten Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper handelte. Nach 30-minütiger Einwirkzeit wurde erneut mit PBS/RSA (1%) gespült, um die verbliebenen nicht-gebundenen Sekundärantikörper abzuwaschen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe des ebenfalls im Kit enthaltenen enzymgekoppelten Komplexes zu den Präparaten. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurden ungebundene Komplexe mit PBS/RSA (1%) abgespült.

Nun wurde das Substratchromogen AEC zwei Mal für eine Inkubationszeit von je 15 Minuten zugegeben. Das Chromogen wurde durch die Peroxidase oxidiert, es resultierte eine Rot-Braunfärbung. Zwischen den beiden Zugaben des AEC wurden die Präparate nicht gespült. Anschließend wurden die Präparate mit Aqua bidest. gewaschen und die Färbereaktion der Peroxidase damit gestoppt. Abschließend wurden die Präparate aus dem Färbesystem in die Glas-Färbeküvetten zurücksortiert.

Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin und Eindecken der Proben

Um bei der späteren Auswertung eine bessere Übersicht in den Präparaten zu ermöglichen, wurden die Präparate im letzten Schritt mit Hämatoxylin gegengefärbt.

Hierzu wurden die Schnitte nach zwei erneuten Waschvorgängen mit Aqua bidest. für drei Minuten in Mayer's Hämatoxylin inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 2,5 Minuten mit Aqua bidest. gewaschen und dann 5 Mal in Ammoniakwasser getaucht. Dadurch wurde eine Bläuung des Hämatoxylins erreicht. Nach einer letzten Spülung in Aqua bidest. wurden die Präparate mit Mowiol und Deckgläsern eingedeckt.

Nachfolgend ist das Protokoll zur immunhistochemischen Färbung der Paraffinschnitte aufgeführt:

Tabelle 1: Protokoll der immunhistochemischen Färbung

Arbeitsschritte	Lösungen	Mengen (µl)	Inkubationszeit (Min)
1.) Entparaffinieren	Xylol Xylol Xylol		20 20 20
2.) Xylol entfernen	99,8% Ethanol 99,8% Ethanol 99,8% Ethanol		20 20 20
3.) Blockierung der endogenen Peroxidase, um unspezifische Färbungen zu verhindern	0,3% H ₂ O ₂ in Methanol		45
4.) Rehydrierung der Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe	95% Ethanol 95% Ethanol 80% Ethanol 70% Ethanol		2 2 2 2

	Aqua bidest. Aqua bidest.		5 5 Dann in Aqua bidest. bis zur Weiterverarbeitung
5.) Für den nachfolgenden Schritt werden alle Objektträger aus den Glas-Färbeküvetten in mit Citrat-Puffer befüllte Plastikkuvetten umsortiert.			
6.) Demaskierung der Antigene zur Verstärkung der Signalintensität	Im Citrat-Puffer (0,01 M, pH= 6,0) in Mikrowelle Kochen Abkühlen Kochen Abkühlen Kochen		8 4 4 4 4
7.) Im Anschluss müssen die Präparate auf handwarm abkühlen (30 Min) und werden dann in den Körben der Plastikkuvetten für mindestens 5 Minuten in Aqua bidest. gestellt.			
8.) pH-Pufferung, Absättigung der unterschiedlichen Ladungen innerhalb des Gewebes, um unspezifische Bindungen zu verhindern	PBS mit 1% RSA		5
9.) Für die weiteren Schritte werden die Objektträger in Sequenza®-Färbesysteme einsortiert. Bei diesen Systemen entsteht nach Einbringen der Präparate ein kapillärer Spalt, über welchen die weiteren Lösungen zugegeben werden.			
10.) Siehe 8.	PBS mit 1% RSA	1500	
11.) Blockierung unspezifischer Bindungen, um Hintergrundfärbungen zu vermeiden	Ziegen-Serum (VECTASTAIN® Elite® ABC Kit, Peroxidase (Rabbit-IgG))	150	20
12.) Bindung des Antikörpers (AK)	7H49L61	300	Über Nacht bei 4°C
13.) Waschen der Schnitte, um nicht oder unspezifisch gebundene AK zu entfernen	PBS mit 1% RSA	1500	
14.) Nochmaliges Waschen	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, um nicht oder unspezifisch gebundene Komplexe zu entfernen	PBS mit 1% RSA	1500	

19.) 2x für 15 min 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 dem Färbesystem in die Glas-Färbeküvetten zurücksortiert.			
22.) Waschen	Aqua bidest.		1
	Aqua bidest.		1
23.) Gegenfärbung der Zellkerne	Mayer's Hämatoxylin		3 (abhängig von Qualität des Hämatoxylins)
24.) Waschen	Aqua bidest.		2,5
25.) Hämatoxylin-Bläuung	Ammoniakwasser		5x Eintauchen
26.) Waschen	Aqua bidest.		2,5; dann in Aqua bidest. stellen
Im Anschluss daran werden die Präparate mit Mowiol und Deckgläsern eingedeckt.			

4.2.4. Auswertung der Immunhistochemie

Lichtmikroskopie

Die Auswertung der gefärbten Schnitte erfolgte mittels eines Lichtmikroskops der Firma Leica in 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung. Es wurde die Farbintensität der gefärbten Gewebeproben beurteilt, die Expression der Färbung in membranständig und/oder zytosolisch eingeordnet und eine Abschätzung des Prozentsatzes der gefärbten Zellen im Vergleich zu den ungefärbten vorgenommen und die Verteilung in den verschiedenen Zelltypen des Gewebes beschrieben. Bei den Tumorgeweben erfolgte zudem eine semiquantitative Bewertung der Expressionsstärke mit Hilfe des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner (1987).

Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner

Bei der Bestimmung des IRS wird der prozentuale Anteil der gefärbten Zellen sowie deren Farbeintensität beurteilt und beide Werte miteinander multipliziert. Während die Farbintensität, auch als Staining Intensity (SI) bezeichnet, mit 0 bis 3 Punkten bewertet werden kann, werden bei dem Prozentsatz der gefärbten Zellen, auch Percentage Points (PP) genannt, zwischen 0 und 4 Punkte vergeben. Der Score kann daher Werte zwischen 0 bis 12 annehmen. Ab einem Gesamtscore von größer gleich 3 wird ein Präparat als positiv bewertet.

Die Methode des IRS ist subjektiv. Daher sollte die Auswertung aller Präparate möglichst Aufgabe von nur einer Person sein und am gleichen Mikroskop erfolgen.

Der Immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner wurde 1987 als Vorschlag für ein standardisiertes Vorgehen in der Auswertung von immunhistochemisch gefärbten Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Mammakarzinomen vorgestellt. Auf der Suche nach einem geeigneten Scoring-System für den immunhistochemischen Nachweis von Somatostatin-Rezeptoren wurde der IRS von Specht et al. im Vergleich zum HER2/neu-Score und dem EGFR-Score als am besten geeignet befunden und beschrieben (Remmele und Stegner 1987, Specht et al. 2015).

Tabelle 2: Immunreaktiver Score (IRS) nach Remmele und Stegner (1987)

			Färbeintensität (SI)			
			<i>keine</i>	<i>schwach</i>	<i>mittelgradig</i>	<i>stark</i>
			0	1	2	3
Prozentsatz positiver Zellen (PP)	0%	0	IRS=0	IRS=0	IRS=0	IRS=0
	<10%	1	IRS=0	IRS=1	IRS=2	IRS=3
	10-50%	2	IRS=0	IRS=2	IRS=4	IRS=6
	51-80%	3	IRS=0	IRS=3	IRS=6	IRS=9
	>80%	4	IRS=0	IRS=4	IRS=8	IRS=12

4.3. Statistische Auswertung der immunhistochemisch analysierten neuroendokrinen Tumore

Für die statistische Auswertung der zu den neuroendokrinen Tumoren erhobenen Daten sowie für die Erstellung der entsprechenden Grafiken wurde das Programm IBM SPSS Statistics, Version 27, genutzt.

Über den Kolmogorov-Smirnov-Test wurden hier zunächst alle metrischen Daten sowie die ermittelten SST4-IRS-Werte auf eine Normalverteilung hin überprüft. Dabei zeigte sich, dass alle Daten mit Ausnahme des Alters der Patienten nicht normalverteilt waren. Hieraus ergab sich die Verwendung nicht-parametrischer Testverfahren für die weitere statistische Auswertung, wie der Mann-Whitney-, der Kendall-Tau-b- oder Spearman-Rho-Test. Bei allen Tests wurde das Ergebnis ab einen p-Wert von $\leq 0,05$ als signifikant angesehen.

5. Ergebnisse

5.1. Immunhistochemische Untersuchungen

5.1.1. Immunhistochemische Untersuchung der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression in humanen Normalgeweben

5.1.1.1. Cortex

In den Cortex-Präparaten zeigten die Pyramidenzellen in den Laminae III (Lamina pyramidalis externa) und V (Lamina pyramidalis interna) eine deutliche zytoplasmatische Anfärbung in den Perikaryen sowie in den Neuriten und Dendriten (Abbildung 4). Andere Schichten und Zellen des Cortex waren kaum bis nicht gefärbt. In einigen Präparaten war die Schichtung des Cortex nicht klar zu erkennen und die angefärbten Pyramidenzellen waren im Präparat gleichmäßig verteilt.

An drei Cortex-Präparaten waren Peptidneutralisationen durchgeführt worden. Alle drei Präparate, die mit dem Peptid 1 inkubiert worden waren, welches als Antigen für die Immunisierung des Kaninchens verwendet worden war, zeigten sich negativ.

Vier weitere Cortex-Präparate waren mit dem Peptid 2 inkubiert worden, welches einem anderen Epitop des SST4 entspricht, als das Peptid 1. Bei drei dieser Präparate zeigte sich eine regelrechte Anfärbung der Pyramidenzellen, vergleichbar mit den Präparaten ohne vorherige Peptid-Inkubation.

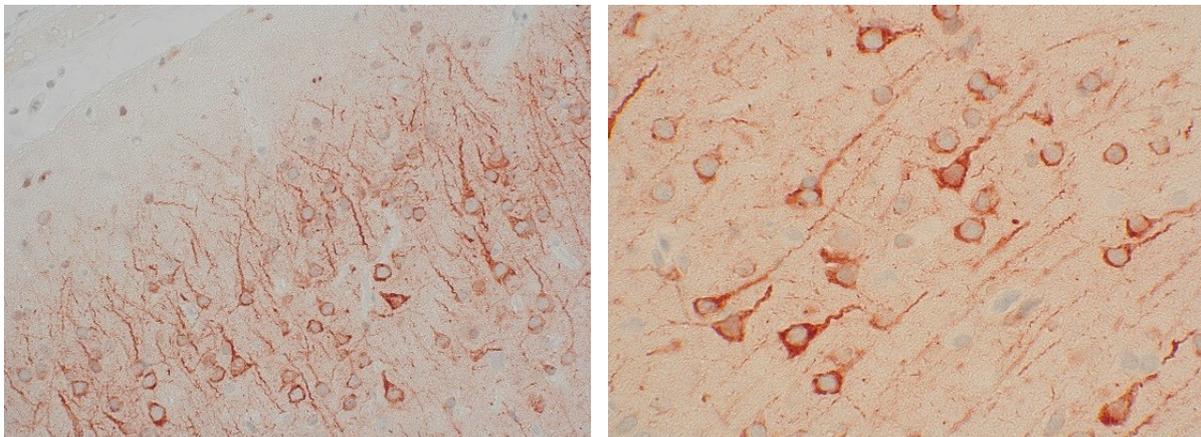


Abbildung 4: SST4-Expression im menschlichen Cortex. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 200x (links), 400x (rechts).

5.1.1.2. Trigeminusganglien

Die Perikaryen der Trigeminusganglien in den Präparaten wiesen eine deutliche zytoplasmatische Expression des SST4 auf. Ebenfalls als deutlich SST4-positiv präsentierten sich die Dendriten der Neurone. In den umgebenden Mantelzellen war eine zytoplasmatische Färbung, allerdings

unterschiedlicher Intensität, zu beobachten: Einige Mantelzellen waren stark, andere mäßig, schwach oder nicht angefärbt (Abbildung 5).

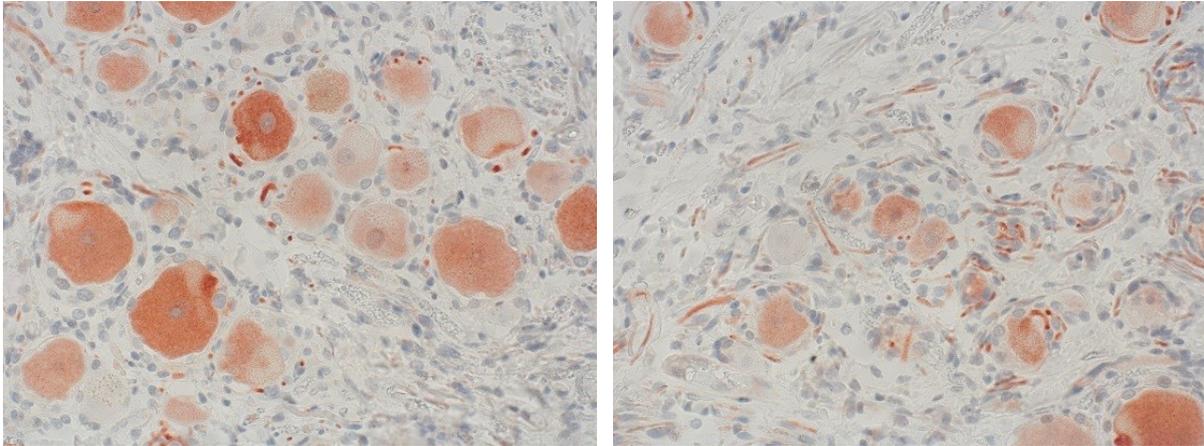


Abbildung 5: SST4-Expression in humanen Trigeminalganglien. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.3. Hypophyse

In den drei untersuchten Präparaten humaner Hypophysen konnte in der Neurohypophyse eine gleichmäßig verteilte, mäßig ausgeprägte zytosolische Anfärbung in den Nervenfasern verzeichnet werden. Die Perikaryen zeigten keine immunhistochemische Reaktion. Im Vorderlappen war in nur wenigen Zellen eine zarte zytoplasmatische Anfärbung zu beobachten.

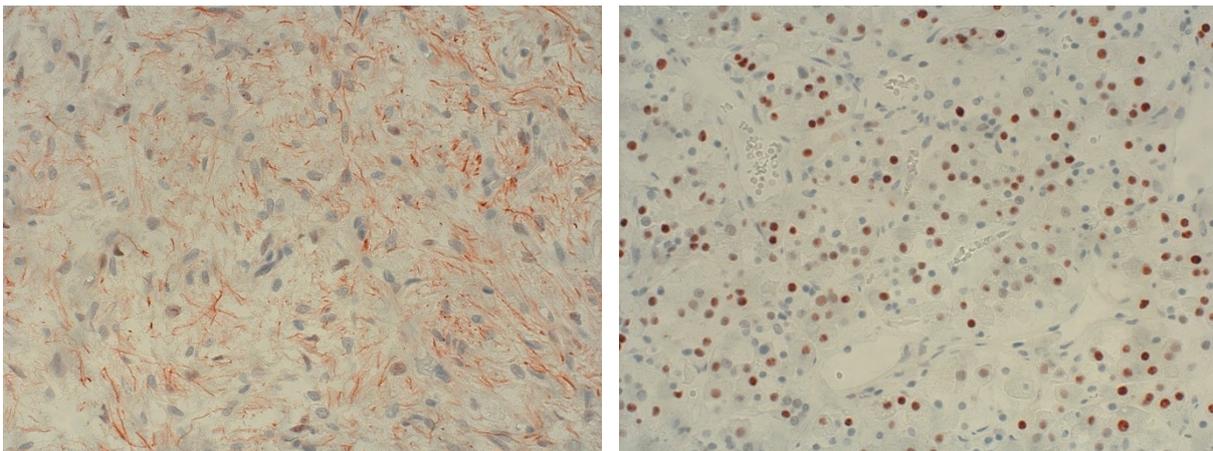


Abbildung 6: SST4-Expression in der humanen Neurohypophyse (links) und Adenohypophyse (rechts). Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung 400x.

5.1.1.4. Plazenta

In den untersuchten Schnitten der menschlichen Plazenta zeigte sich eine deutliche Anfärbung der Zellen des Trophoblasten sowie der Dezidua-Zellen. Der SST4 wurde in diesen Zellen vor allem zytosolisch, in geringerem Maße auch membranständig exprimiert (Abbildung 7).

An drei Plazenta-Präparaten war eine Peptidneutralisation mit dem Peptid 1 vorgenommen worden. Diese Präparate zeigten sich allesamt negativ (Abbildung 8).

Zwei von vier Präparaten, welche vor der Immunhistochemie mit dem Peptid 2 inkubiert worden waren, zeigten eine Färbung wie ohne Peptidinkubation (Abbildung 8).

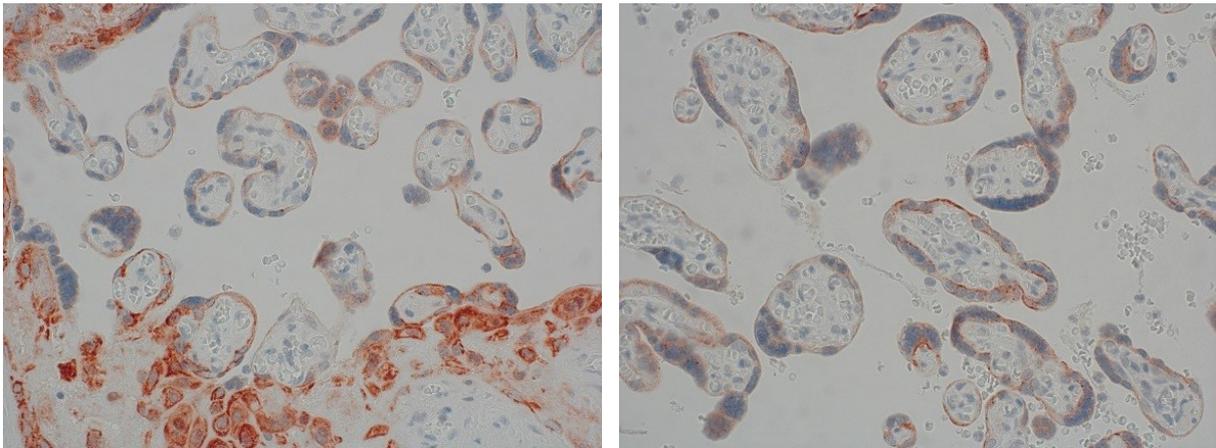


Abbildung 7: SST4-Expression in der menschlichen Plazenta. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

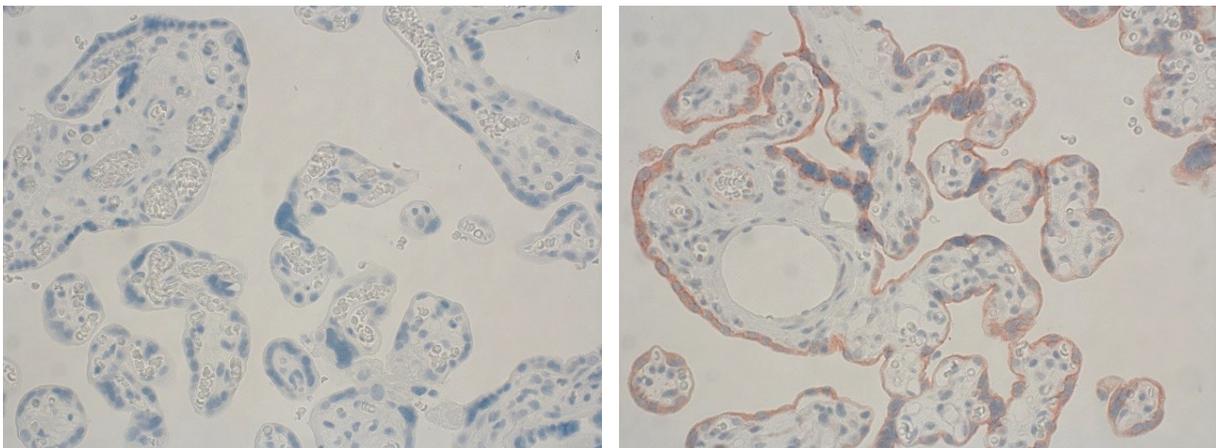


Abbildung 8: Spezifitätskontrolle des Antikörpers mittels Peptidneutralisation an Präparaten der menschlichen Plazenta. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. **Links:** Die Peptidneutralisation mit dem Peptid 1 führte zur Auslöschung des Immunsignals. **Rechts:** Die Inkubation des Präparates mit dem Peptid 2 hatte keinen Einfluss auf die immunhistochemische Anfärbung (rot-braune Färbung).

5.1.1.5. Herz

Im Herzgewebe fand sich keine immunhistochemische Anfärbung. Somit konnte eine Expression des SST4 in den Herzmuskelzellen weitestgehend ausgeschlossen werden.

5.1.1.6. Lymphknoten

Die fünf immunhistochemisch gefärbten Lymphknotenpräparate zeigten sich allesamt komplett negativ. Eine SST4-Expression konnte weder in den Blutgefäßen, den Fibroblasten, den elastischen Fasern noch in den vorhandenen Lymphozyten nachgewiesen werden.

5.1.1.7. Bronchus

Das ausgewertete Präparat eines menschlichen Bronchus wies eine intensive zytosolische Färbung der hochprismatischen Zellen des Respirationsepithels auf, während sich die Flimmerhärchen durchweg ungefärbt darstellten (Abbildung 9). Unterhalb der Basalmembran des Epithels war keine SST4-Expression mehr zu beobachten.

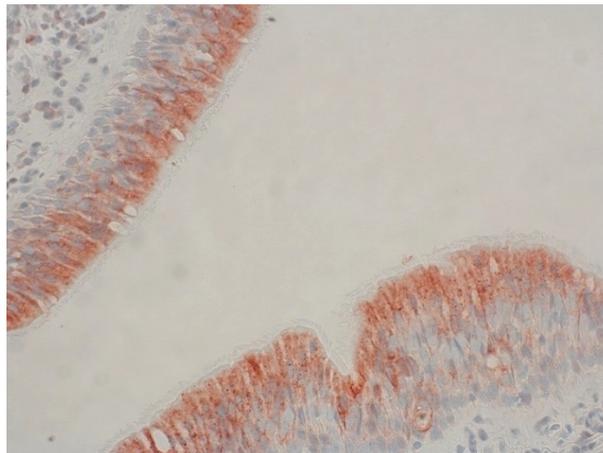


Abbildung 9: SST4-Expression im menschlichen Bronchialepithel. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.8. Lunge

Im untersuchten Lungengewebe wurde keine Anfärbung und somit keine SST4-Expression beobachtet.

5.1.1.9. Schilddrüse

Das analysierte Normalgewebe der angeschnittenen Schilddrüse befand sich in einem Tumor-Präparat, welches ein Kleinzelliges Bronchialkarzinom beinhaltete.

Die Epithelzellen und die Stromazellen des gesunden Schilddrüsengewebes stellten sich SST4-negativ dar. Das gesamte Kolloid zeigte eine unspezifische Anfärbung, welche nicht in die Bewertung des Gewebes hinsichtlich einer SST4-Expression einfluss.

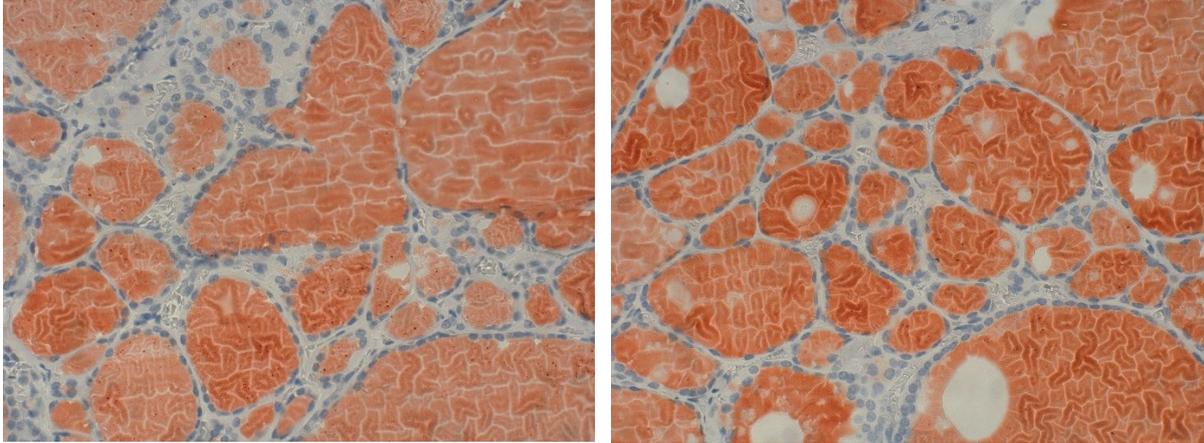


Abbildung 10: SST4-Expression in der humanen Schilddrüse mit unspezifischer Kolloidfärbung. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.10. Nebenschilddrüse

Das Normalgewebe der Nebenschilddrüse wurde in einem Tumor-Präparat eines Nebenschilddrüsenadenoms untersucht und beschrieben. Es lag im Präparat parallel zu dem neoplastisch veränderten Gewebe vor.

Die gesunden Zellen der Nebenschilddrüse zeigten sich nahezu durchgehend membranständig und zytoplasmatisch SST4-positiv. Die zytoplasmatische Anfärbung der Zellen wies dabei eine mäßige Farbintensität auf.

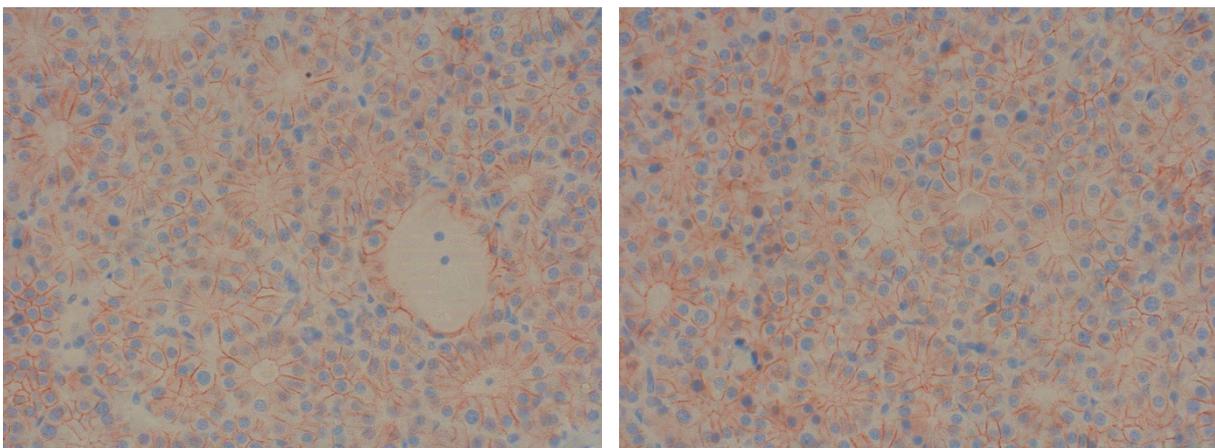


Abbildung 11: SST4-Expression in der menschlichen Nebenschilddrüse. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.11. Leber

In den Leberpräparaten zeigten sich die Zellen der angeschnittenen Gallenwege deutlich SST4-positiv. Die Hepatozyten hingegen waren nur in vereinzelt, im Gewebe verteilten Gruppierungen und dann sehr schwach zytosolisch angefärbt. In vielen Gewebsregionen konnte jedoch keine Anfärbung verzeichnet werden.

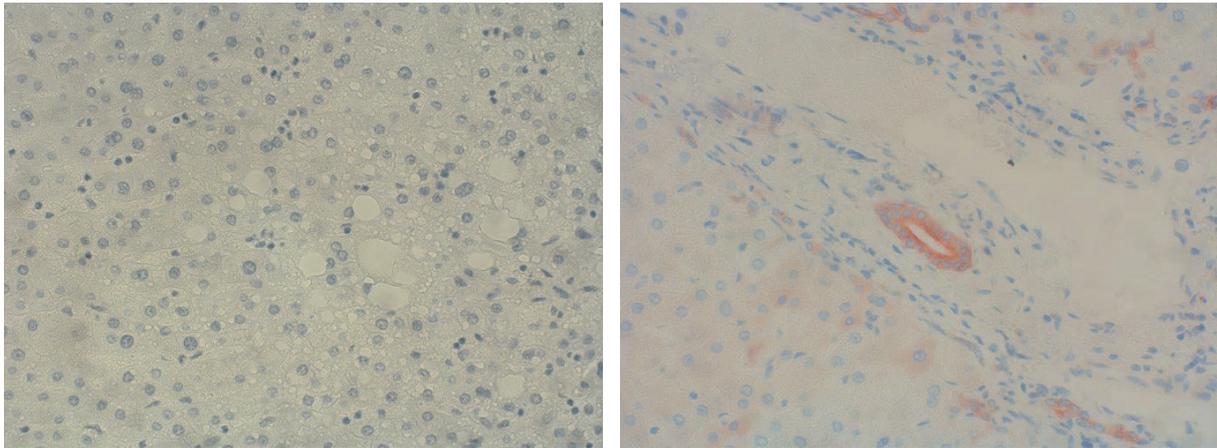


Abbildung 12: SST4-Expression in der humanen Leber. **Rechts:** SST4-positiver Gallengang. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.12. Milz

Das Milzgewebe im untersuchten Präparat fand sich keine Anfärbung und somit keinen Hinweis auf ein Vorkommen des SST4.

5.1.1.13. Pankreas

In den Gewebspräparaten des Pankreas zeigten die Zellen des exokrinen Pankreas eine zytoplasmatische sowie eine membranständige Anfärbung. Auch die Ausführungsgänge des Pankreas wurden als SST4-positiv gewertet, wobei einige Ausführungsgänge eine deutliche membranständige Anfärbung aufwiesen und bei anderen kein Immunsignal zu beobachten war. Insgesamt war die Anfärbung sowie die Farbintensität in den verschiedenen Bereichen des exokrinen Pankreasgewebes sehr unterschiedlich ausgeprägt. Im Gegensatz dazu stellten sich die Inselzellen des Pankreas als komplett SST4-negativ dar.

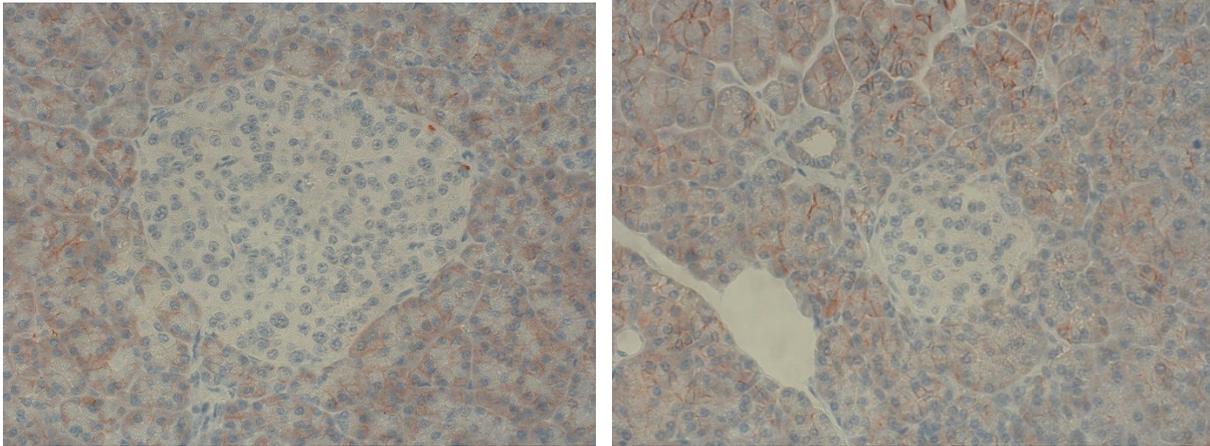


Abbildung 13: SST4-Expression im menschlichen Pankreas. Gut erkennbare SST4-Negativität der Pankreas-Inseln bei membranständiger und zytosolischer Anfärbung des umliegenden exokrinen Gewebes (rechts und links). Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.14. Niere

Die Präparate der menschlichen Niere ließen eine regional unterschiedlich ausgeprägte zytosolische SST4-Expression in den distalen und proximalen Tubuli erkennen. Dabei waren die distalen Tubuli im Durchschnitt intensiver und öfter angefärbt als die proximalen (Abbildung 14, links). Die Sammelrohre zeigten sich ungefärbt und somit SST4-negativ.

Auch in den Glomeruli der Präparate konnte eine zarte zytosolische Anfärbung der Zellen beobachtet werden, wobei die Bowman-Kapsel sich durchgehend SST4-negativ präsentierte (Abbildung 14, rechts).

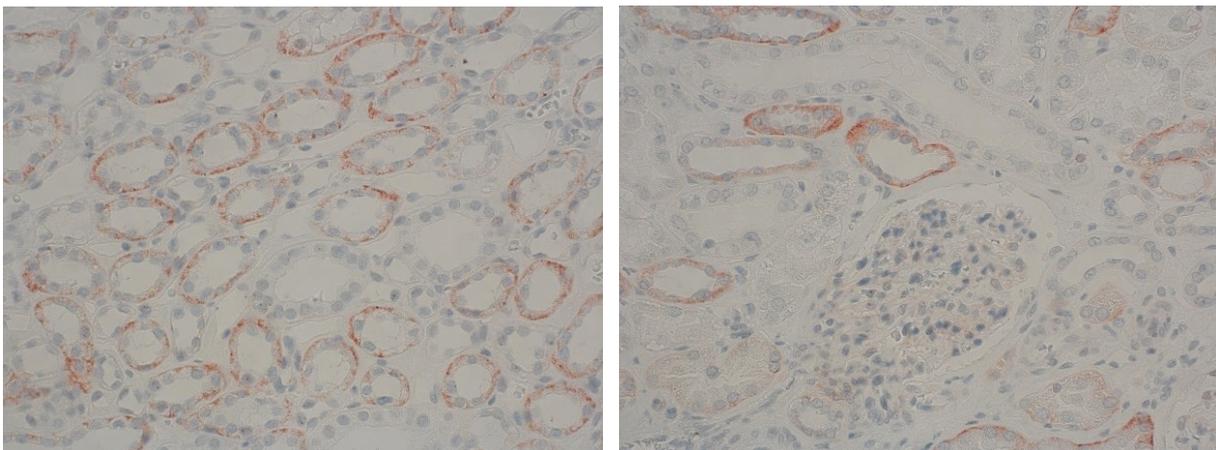


Abbildung 14: SST4-Expression in der menschlichen Niere. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung 400x. **Links:** Deutliche Anfärbung der Zellen in den distalen Tubuli, teils auch der proximalen Tubuli. **Rechts:** Leichte zytosolische Anfärbung der Zellen eines Glomerulus bei negativer Bowman-Kapsel.

5.1.1.15. Nebennierenrinde

Die Zoneneinteilung des Nebennierencortex war in den Präparaten gut nachvollziehbar. Die äußere Zona glomerulosa stellte sich schwach bis mäßig SST4-positiv dar, wobei das Immunsignal zytosolisch und membranständig vorlag. Die mittlere Zona fasciculata wies eine stark membranständige sowie eine zytosolische Färbung der Zellen auf (Abbildung 15, links). In der inneren Zona reticularis war ebenfalls eine membranständige und zytosolische Anfärbung der Zellen zu beobachten (Abbildung 15, rechts). Das angeschnittene Nebennierenmark stellte sich SST4-negativ dar.

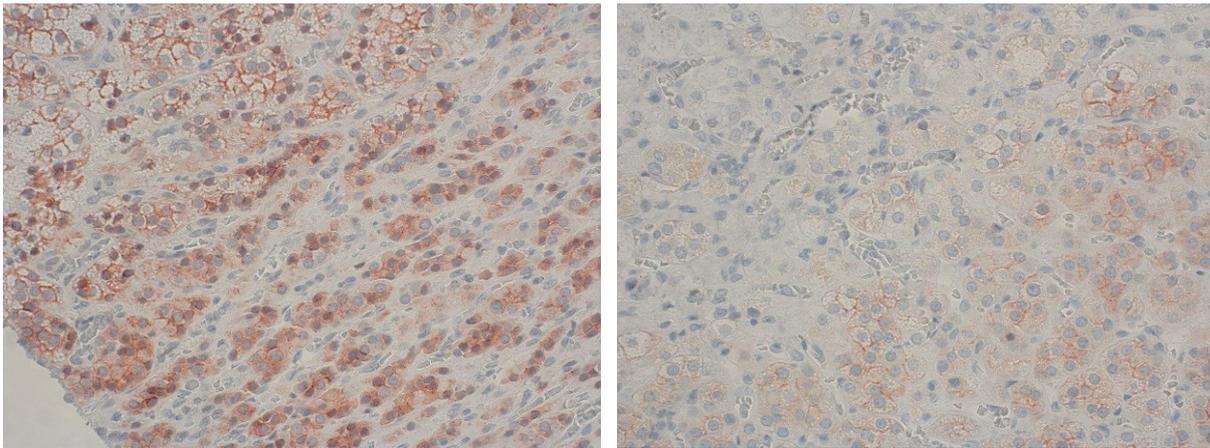


Abbildung 15: SST4-Expression in der menschlichen Nebennierenrinde. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. **Links:** Von links unten nach rechts oben: Kapsel, Zona glomerulosa, Zona fasciculata. **Rechts:** rechts unten: Zona reticularis, links oben: Nebennierenmark.

5.1.1.16. Magen

Das gesunde menschliche Magengewebe wurde anhand von zwei Präparaten eines Gastrointestinalen Stroma-Tumors (GIST), in welchem es parallel zu den neoplastischen Zellen vorlag, untersucht und beschrieben.

Die Drüsenzellen der Magenschleimhaut zeigten eine intensive membranständige und zytosolische Anfärbung. Die Tela submucosa sowie weitere darunter liegende Gewebsschichten wiesen keine Anfärbung auf. Auch das Bindegewebe zwischen den Drüsenzellen stellte sich SST4-negativ dar.

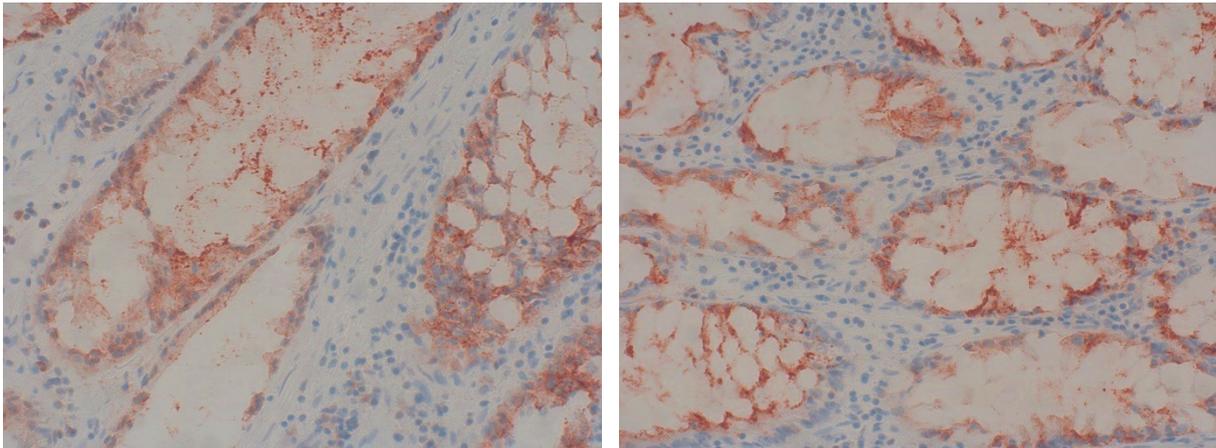


Abbildung 16: SST4-Expression im Magen. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.17. Duodenum

Alle drei Präparate des menschlichen Duodenums präsentierten sich deutlich SST4-positiv. Eine membranständige Anfärbung fand sich in den Mikrovilli sowie in den einschichtigen Zylinderepithelzellen der Krypten und der Zotten, bei welchen ebenso eine deutliche SST4-Expression an den Zell-Zell-Kontaktstellen zu sehen war. Das membranständige Vorkommen des SST4 wurde auch in den Panethzellen am Grunde der Krypten und in den Brunnerdrüsen in der Submukosa beobachtet. Eine leichte membranständige Färbung wurde zusätzlich in der aufgelockerten Submukosa innerhalb der Zotten gefunden.

SST4-positiv waren zudem die angeschnittenen Ganglienzellen, welche in einem der Präparate dargestellt werden konnten.

Die Becherzellen imponierten in allen drei Präparaten mit einer intensiven, unspezifischen Anfärbung.

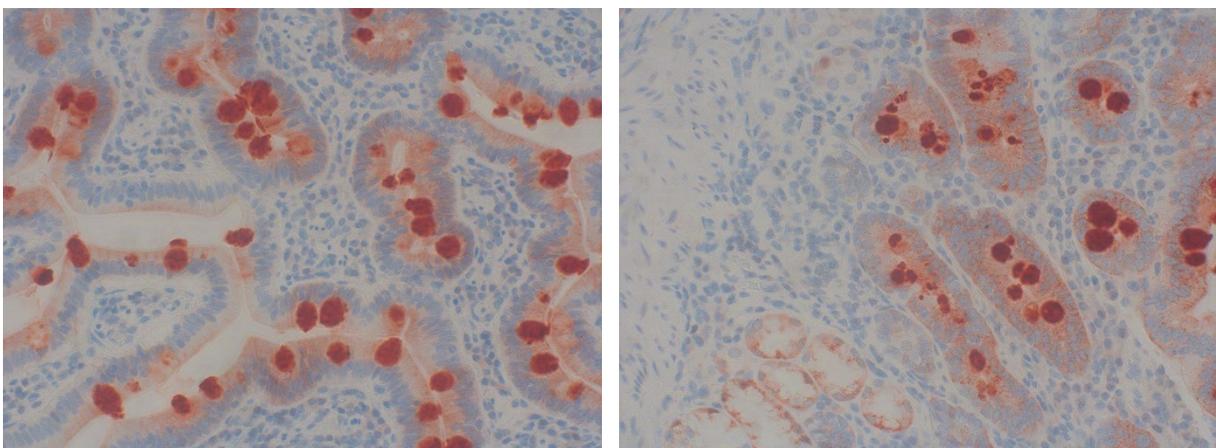


Abbildung 17: SST4-Expression im Duodenum. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.18. Colon transversum

Das Gewebe des menschlichen Colon transversum wies in beiden Präparaten eine deutliche membranständige Anfärbung der Epithelzellen sowohl apikal als auch an den Zell-Zell-Kontaktstellen auf. Eine leichte Anfärbung ließ sich auch in den Lymphfollikeln in der Tela submukosa sowie in den intramuralen Ganglien beobachten.

Die Becherzellen des Colon transversum zeigten sich unspezifisch und intensiv rot angefärbt.

5.1.1.19. Knochen

Die fünf untersuchten Knochenstanzen zeigten sich komplett SST4-negativ. Auch das enthaltene Knochenmark ließ keine Färbung erkennen.

5.1.1.20. Fettgewebe

Das Fettgewebe wurde in einem Tumor-Präparat des Malignen Melanoms untersucht, in welchem es parallel zum neoplastischen Gewebe vorlag. Es stellte sich als komplett SST-negativ dar.

5.1.1.21. Blutgefäße

Die Blutgefäße, welche unter anderem in einem Tumor-Präparat des Malignen Melanoms analysiert werden konnten und sowohl Arterien als auch Venen umfassten, stellten sich durchweg ohne Anfärbung und somit SST4-negativ dar.

5.1.1.22. Mamma

Das Normalgewebe der Mamma wurde an einem Tumor-Präparat eines Mammakarzinoms ausgewertet, bei welchem gesundes Gewebe parallel zu neoplastischem vorlag.

Die Epithelzellen der Duktus wiesen eine intensive zytoplasmatische und membranständige Anfärbung auf (Abbildung 18). Das umgebende Bindegewebe zeigte keine SST4-Expression.

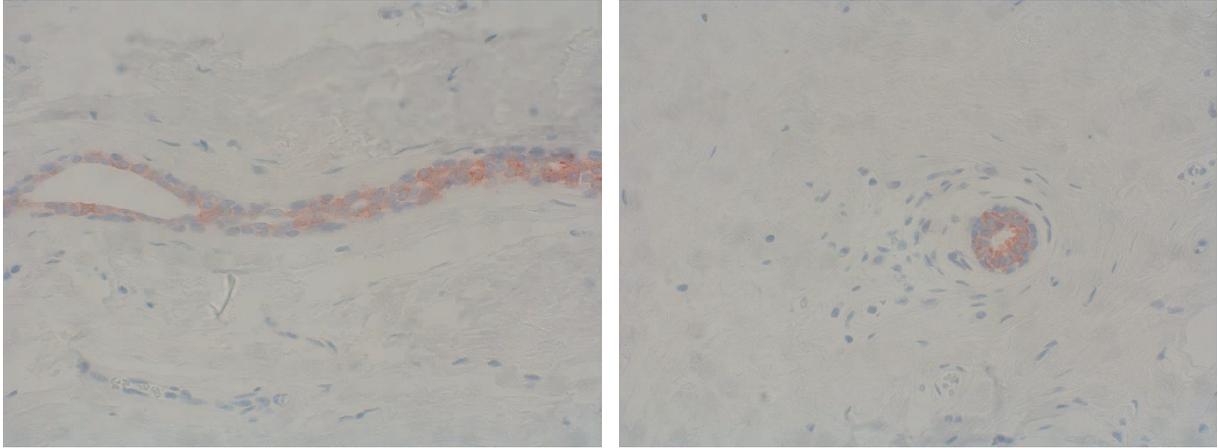


Abbildung 18: SST4-Expression in der Mamma. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.23. Ovar

Das Normalgewebe des Ovars wurde an zwei Tumor-Präparaten von Ovarialkarzinomen ausgewertet, in welchen gesundes Gewebe neben neoplastisch verändertem Gewebe nachgewiesen werden konnte. Beide Präparate zeigten Ovarie mit zahlreichen Primordialfollikeln.

Im Ovar stellten sich einzelne Zellen der Theca interna zytoplasmatisch stark gefärbt dar. Eine zytoplasmatische, leichte bis mäßige Anfärbung einiger Zellgruppen fand sich außerdem in Bereichen, in welchen Peritoneum und Ovarial-Rinde eng beieinander lagen, sowie in einigen rindennahen Zellen der Primordialfollikel-Begrenzung.

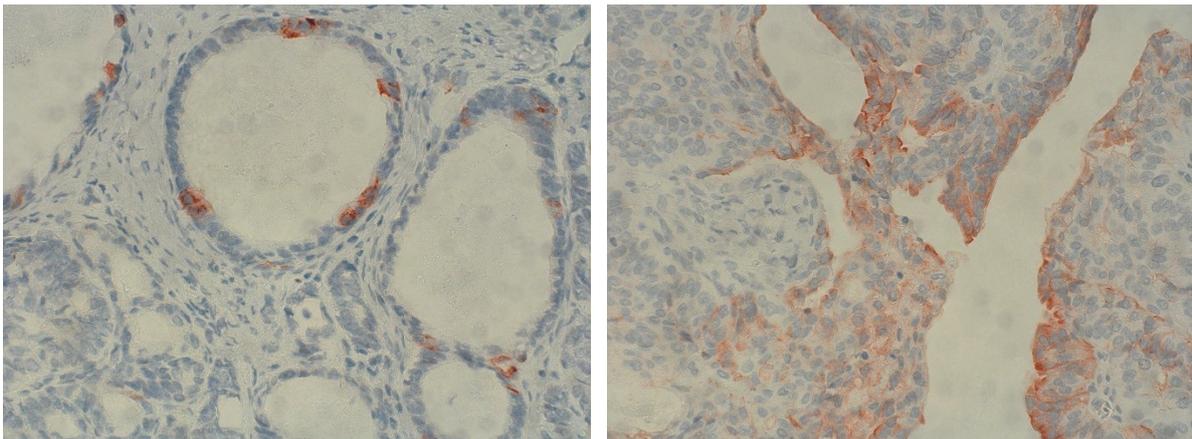


Abbildung 19: SST4-Expression im menschlichen Ovar. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. **Links:** Primordialfollikel.

5.1.1.24. Tuba uterina

Das gesunde Gewebe der Tuba uterina wurde an einem Tumor-Präparat eines Ovarial-Karzinoms ausgewertet, in welchem es neben neoplastisch veränderten Ovarialzellen vorlag.

Die Epithelzellen der menschlichen Tuba uterina präsentierten sich mit einer durchgehend intensiven zytosolischen und membranständigen Anfärbung. Das Stroma stellte sich SST4-negativ dar.

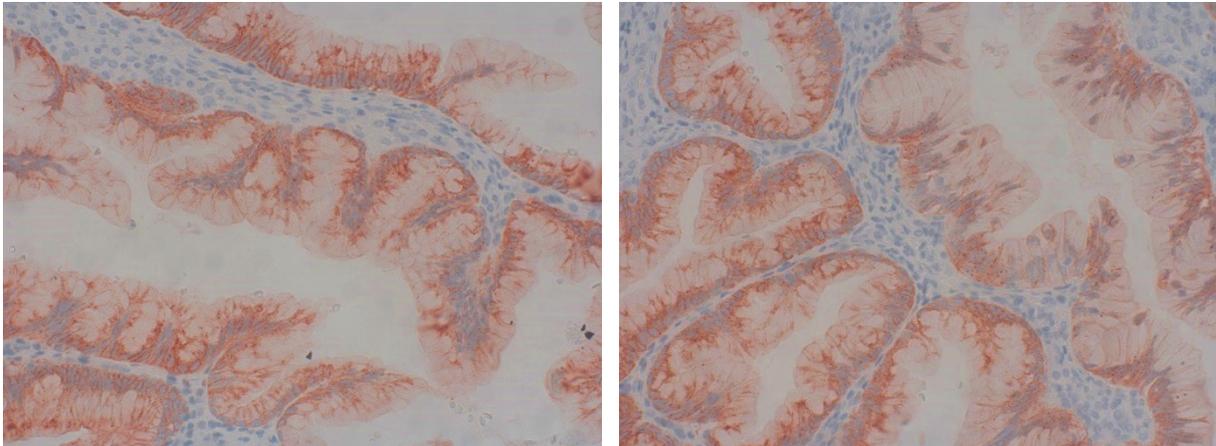


Abbildung 20: SST4-Expression der Tuba uterina. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.25. Zervix

Das Normalgewebe der Zervix wurde anhand eines Tumor-Präparates eines Zervix-Karzinoms ausgewertet, in welchem gesundes Gewebe parallel zu neoplastisch verändertem vorhanden war.

Die Epithelzellen der Zervixdrüsen stellten sich zytosolisch leicht bis mäßig SST4-positiv dar. Die darunterliegenden Schichten aus Bindegewebe, glatter Muskulatur und elastischen Fasern zeigten keine Anfärbung.

5.1.1.26. Prostata

Das Normalgewebe der Prostata wurde in einem Tumorschnitt eines Prostata-Karzinoms ausgewertet, in welchem es neben dem neoplastisch veränderten Gewebe aufgefunden werden konnte.

Die gesunden Prostatazellen im Präparat wiesen keine Anfärbung und somit keinen Hinweis auf eine SST4-Expression auf.

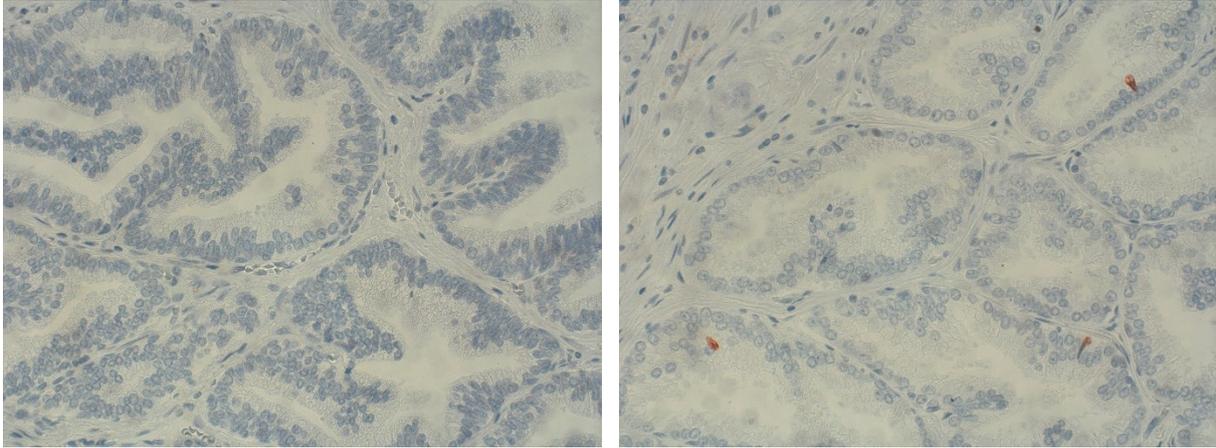


Abbildung 21: SST4-Expression in der menschlichen Prostata. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.27. Hoden

Das gesunde Gewebe des menschlichen Hodens wurde an zwei Hodentumor-Präparaten untersucht, in welchen es zusätzlich zu den neoplastisch veränderten Zellen auftrat.

Die Zellen der Hodentubuli zeigten ein sehr unterschiedliches Färbeverhalten: Einzelne Zellen wiesen eine kräftige und einige eine zarte bis mäßige zytoplasmatische Anfärbung auf. In anderen Tubuli seminiferi zeigten die Zellen keinerlei Färbung. Das Stroma stellte sich komplett SST4-negativ dar.

5.1.2. Immunhistochemische Untersuchung der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression in humanen Tumorgeweben

5.1.2.1. Glioblastom

Bei allen 9 Glioblastom-Präparaten konnte eine mäßige bis starke zytoplasmatische Färbung verzeichnet werden. Die SST4-positiven Glioblastomzellen zeigten sich im Tumorgewebe gleichmäßig verteilt und ohne Gruppierungstendenz und befanden sich überwiegend in den äußeren Wachstumszonen des Tumors, wobei hier auch Regionen mit nur geringer Anzahl an angefärbten Zellen zu beobachten waren (Abbildung 22). Die Anzahl der angefärbten Zellen sowie die Intensität ihrer zytoplasmatischen Färbung nahm in Richtung des Tumorsinneren ab. Das Tumorsinnere selbst war weitestgehend nicht angefärbt. Verkalkte, nekrotische oder Areale mit Einblutungen präsentierten sich ebenfalls ohne Anfärbung.

Insgesamt wurde für die Glioblastome ein gemittelter IRS von 6,78 errechnet, wobei der niedrigste IRS bei 4,5 und der Maximalwert bei 9 lag (Tabelle 3).

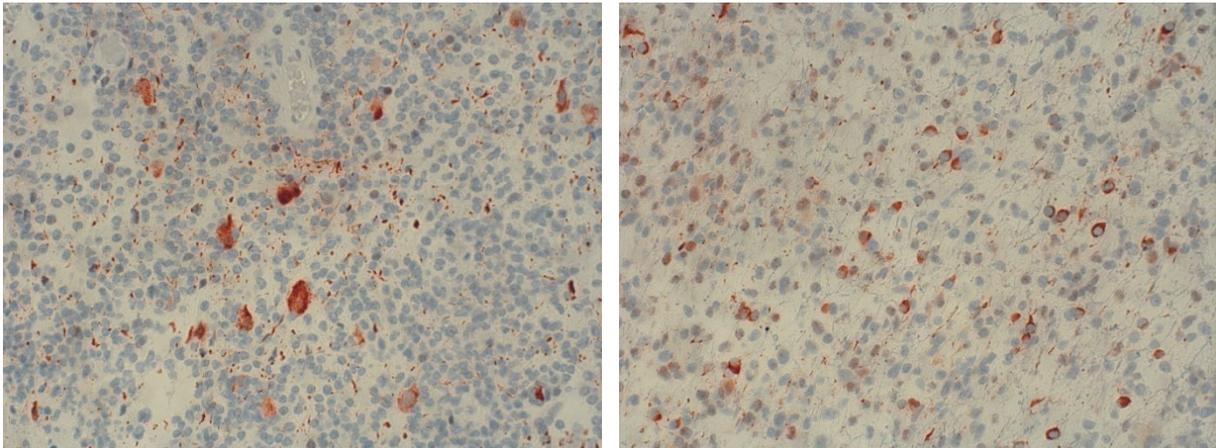


Abbildung 22: SST4-Expression im Glioblastom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.2. Hypophysenadenom

In den beiden ausgewerteten Präparaten menschlicher Hypophysenadenome konnte ein äußerst unterschiedliches Anfärbeverhalten verzeichnet werden: Während sich ein Präparat SST4-negativ präsentierte und mit dem Minimalwert von 0 bewertet wurde, zeigte das andere Präparat eine mäßig bis intensive zytoplasmatische Anfärbung fast aller Zellen und wurde mit einem IRS von 10 bewertet.

Der gemittelte IRS der ausgewerteten Hypophysenadenome betrug somit 5,00 (Tabelle 3).

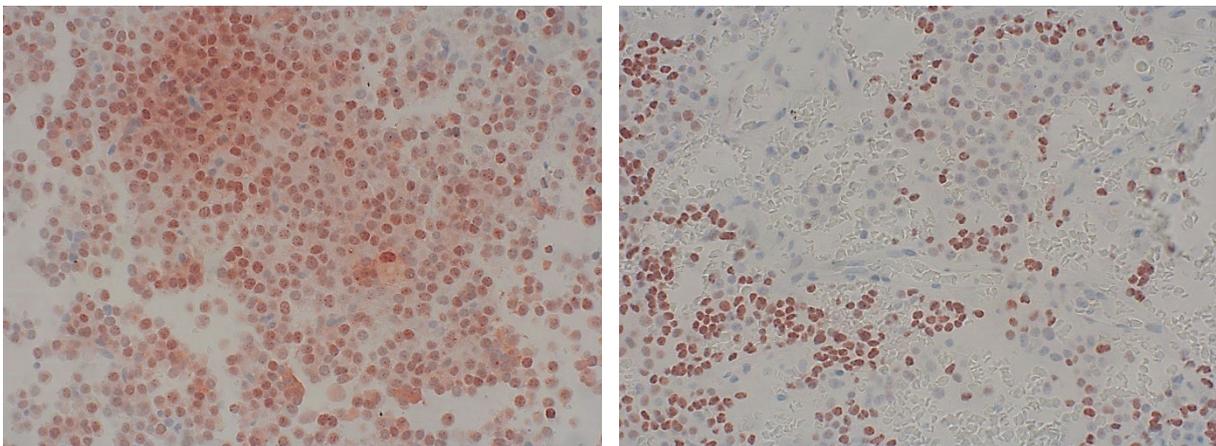


Abbildung 23: SST4-Expression im Hypophysenadenom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.3. Adenokarzinom der Lunge

In den 12 Präparaten der Adenokarzinome der Lunge war eine große Variabilität in ihrer SST4-Expression zu beobachten. Dabei zeigten sich 3 Präparate komplett SST4-negativ. 4 Präparate wiesen eine diffus verteilte Anfärbung einzelner Tumorzellen auf. In den weiteren 5

Präparaten zeigte sich eine intensive, sowohl zytoplasmatische als auch membranständige Anfärbung der neoplastischen Epithelzellen (Abbildung 24). Dabei traten innerhalb eines Tumorschnittes teils große regionale Unterschiede in der SST4-Expression der Tumorzellen auf.

Insgesamt wurde im Mittel ein IRS von 4,50, ein Minimalwert von 0 und einmal ein Maximalwert von 9 vergeben (Tabelle 3).

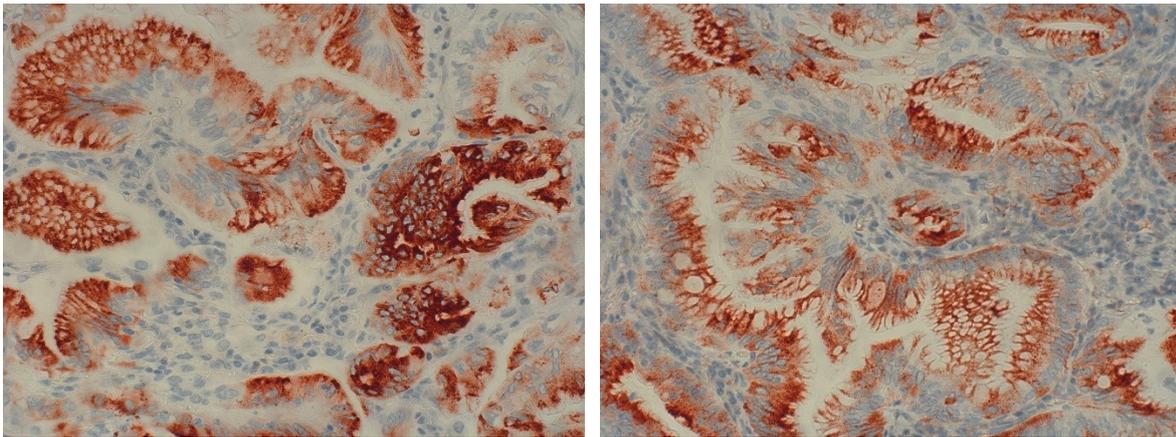


Abbildung 24: SST4-Expression im Adenokarzinom der Lunge. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.4. Plattenepithelkarzinom der Lunge

Die 10 ausgewerteten Präparate des Plattenepithelkarzinoms zeigten sich allesamt SST4-negativ. Sehr vereinzelt fanden sich in einigen Schnitten kleine Zellnester mit zarter membranständiger und zytoplasmatischer Anfärbung. Bei einem Präparat wurde der Maximalwert von 2, bei sechs Präparaten der Minimalwert von 0 vergeben. Insgesamt wurde ein gemittelter IRS von 0,68 errechnet (Tabelle 3).

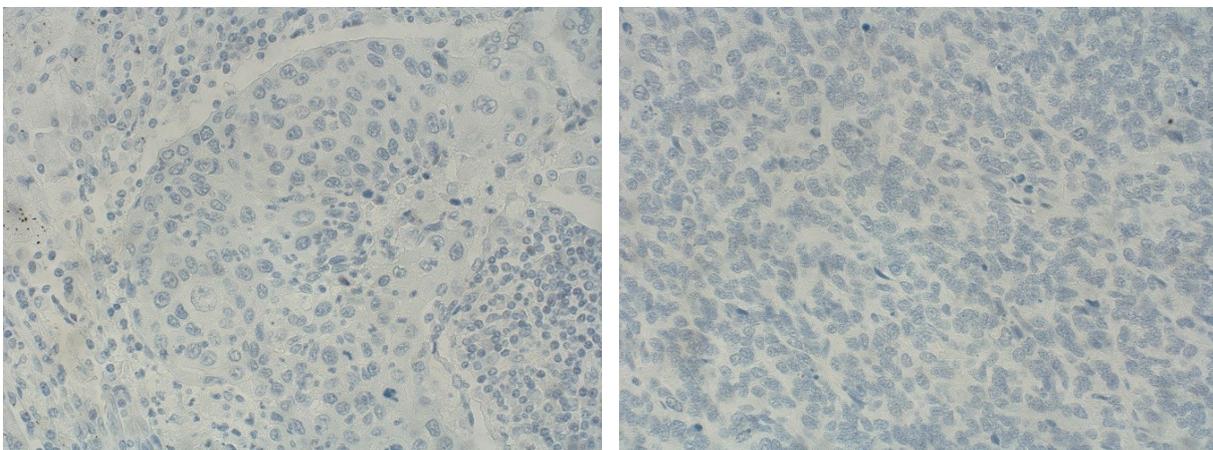


Abbildung 25: SST4-Expression im Plattenepithelkarzinom der Lunge. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.5. Kleinzelliges Lungenkarzinom (SCLC)

Von den neun ausgewerteten SCLC-Präparaten zeigten sich sechs komplett SST4-negativ. Zwei weitere wiesen eine geringe zytosolische und membranständige Anfärbung vereinzelter Zellen auf, welche teilweise gruppiert auftraten. Nur in einem Präparat konnte eine geringgradige zytosolische Anfärbung verzeichnet werden (Abbildung 26). Der hierbei erreichte Maximalwert betrug 5. Insgesamt wurde ein IRS-Mittelwert von 0,78 errechnet (Tabelle 3).

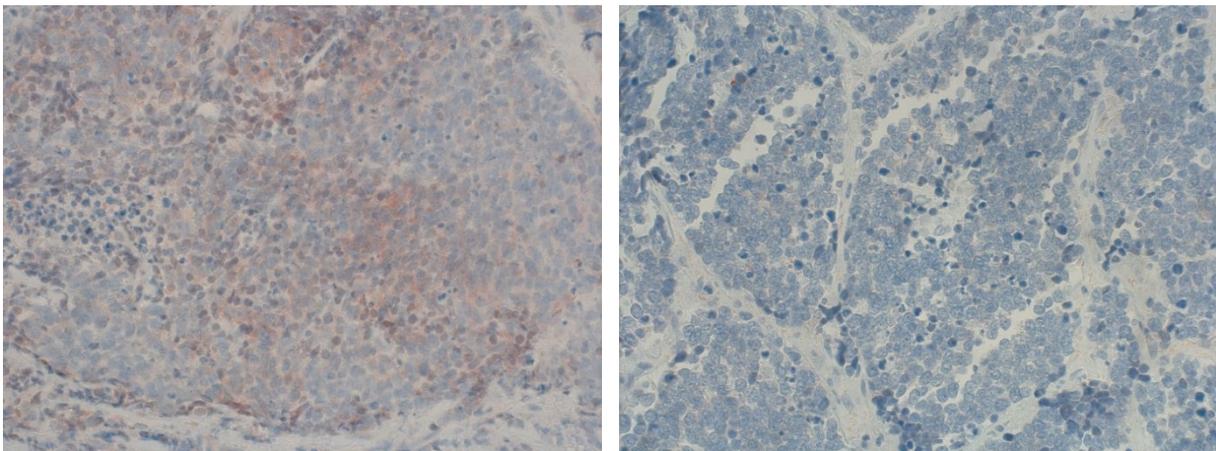


Abbildung 26: SST4-Expression im kleinzelligen Bronchialkarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.6. Nebenschilddrüsenadenom

Die zehn Präparate menschlicher Nebenschilddrüsenadenome präsentierten sich ausnahmslos deutlich SST4-positiv. Während in einigen Schnitten nahezu alle Zellen angefärbt waren und drei Mal der maximal zu erreichende Wert von 12 sowie zusätzlich vier Mal ein Wert von größer gleich 10 vergeben wurde, zeigten einige Präparate im Tumorinneren eine geringere Anzahl gefärbter Zellen sowie eine verringerte Farbintensität im Vergleich zum Tumorrand. Generell wurde die Anfärbung der neoplastischen Zellen als zytosolisch und membranständig bewertet (Abbildung 27 links und rechts). Der geringste IRS von 3 wurde bei nur einem Präparat vergeben (Tabelle 3).

Es wurde ein gemittelter IRS von 9,35 errechnet. Dieser IRS stellt den höchsten Mittelwert dar, der innerhalb der ausgewerteten Tumorentitäten vergeben wurde (Tabelle 3).

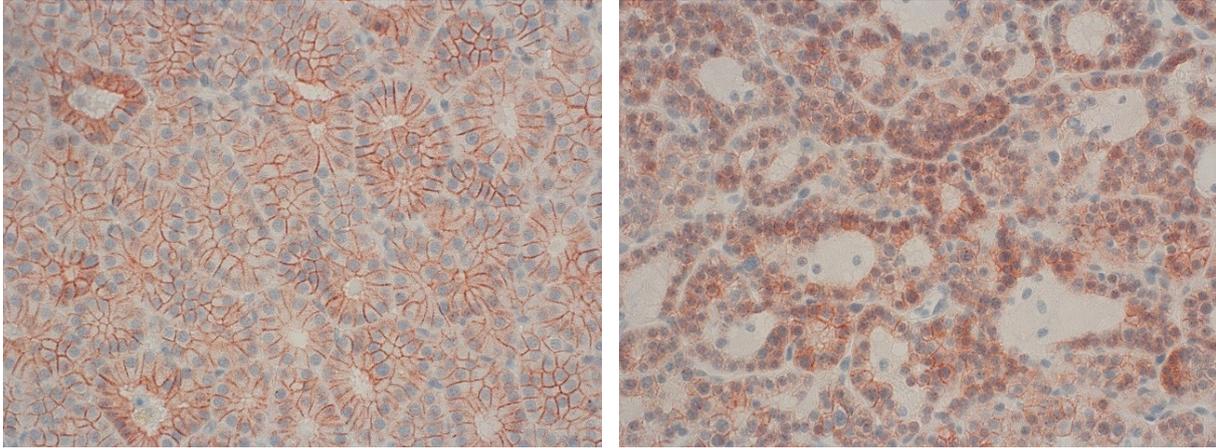


Abbildung 27: SST4-Expression in Nebenschilddrüsenadenomen. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.7. Follikuläres Schilddrüsenkarzinom

Von den zehn ausgewerteten Tumorpräparaten des follikulären Schilddrüsenkarzinoms zeigten sich sieben Schnitte SST4-negativ (Abbildung 28). Bei drei Präparaten wurde der Minimalwert von 0 vergeben. In den drei als SST4-positiv gewerteten Präparaten konnte eine gleichmäßig im Tumorpräparat verteilte, zytosolische Anfärbung einiger Tumorzellen beobachtet werden. Der Maximalwert betrug in einem Präparat 7,5. Insgesamt wurde ein gemittelter IRS von 2,30 vergeben (Tabelle 3).

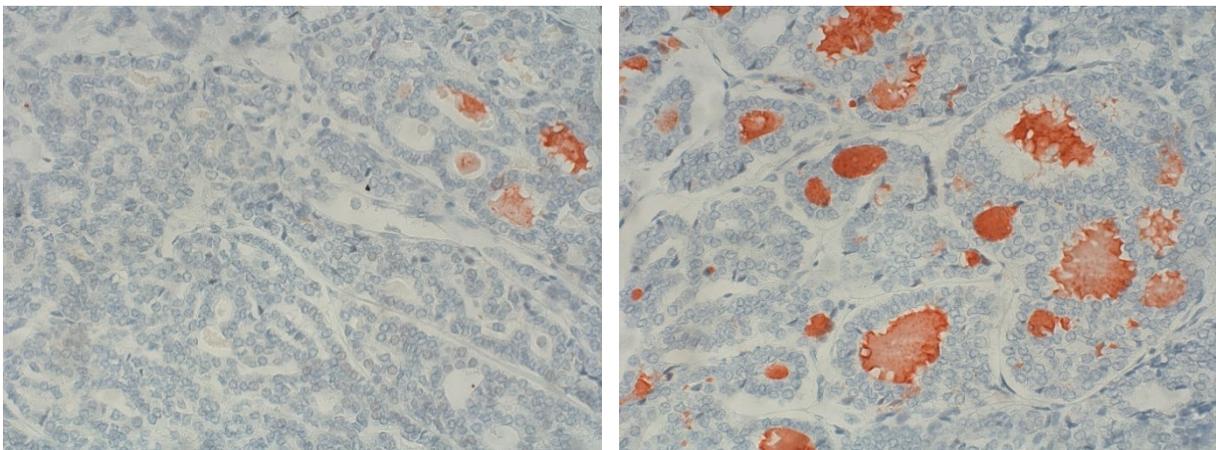


Abbildung 28: SST4-Expression im follikulären Schilddrüsenkarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.8. Papilläres Schilddrüsenkarzinom

In sechs der insgesamt elf ausgewerteten Tumorpräparate des papillären Schilddrüsenkarzinoms konnte eine leichte zytosolische Anfärbung in einigen Tumorzellen

beobachtet werden (Abbildung 29). Die angefärbten Zellen traten in den Präparaten verstreut auf.

Vier der Präparate zeigten sich komplett SST4-negativ und wurden mit dem Minimalwert von 0 bewertet. Der Maximalwert lag bei 5 und wurde nur bei einem Präparat vergeben. Der errechnete IRS-Mittelwert lag bei 2,05 (Tabelle 3).

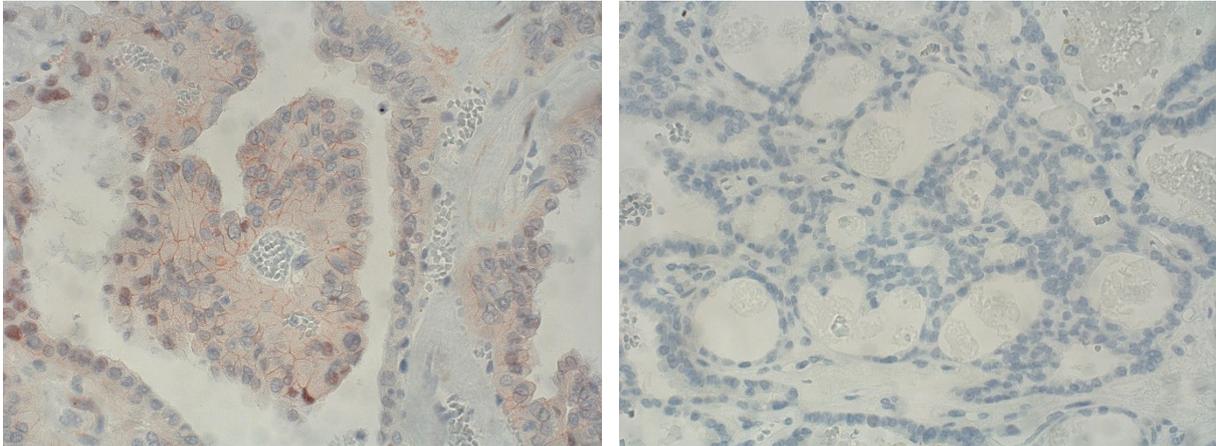


Abbildung 29: SST4-Expression im papillären Schilddrüsenkarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.9. Medulläres Schilddrüsenkarzinom

Sechs der sieben Tumorpräparate des medullären Schilddrüsenkarzinoms wurden als SST4-positiv bewertet. Dabei konnten sehr unterschiedliche Färbeverhalten in den verschiedenen Präparaten beobachtet werden: In einigen Schnitten trat die Anfärbung der Zellen ausgeprägt an der Wachstumszone des Tumors auf, wohingegen das Tumoriinnere nur wenige, verstreut vorkommende SST4-positive Zellen enthielt. In anderen Schnitten, hingegen, zeigten sich die Zellen in der gesamten Tumormasse gleichmäßig und ohne auftretende Gruppierung angefärbt. Insgesamt konnte eine eher zytosolische Anfärbung der Zellen vermerkt werden (Abbildung 30), die sich in ihrer Farbintensität in den unterschiedlichen Präparaten jedoch sehr variabel zeigte und von zart bis intensiv angefärbt reichte.

Es wurde ein gemittelter IRS von 5,18 vergeben. Die Spannweite der IRS-Werte beim medullären Schilddrüsenkarzinom reichte von 0 bis 9.

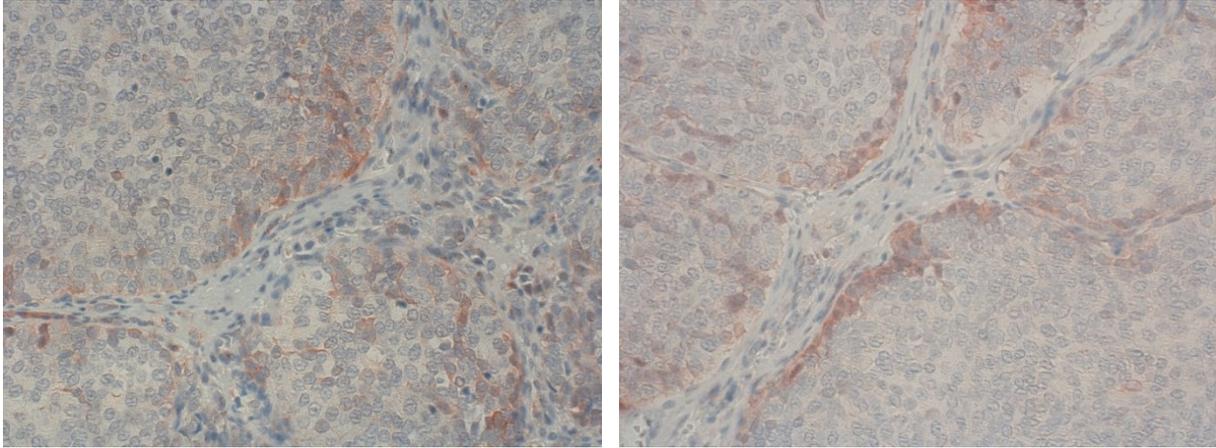


Abbildung 30: SST4-Expression im medullären Schilddrüsenkarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.10. Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom

Vier der acht Präparate des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms wurden als SST4-positiv gewertet. Das Färbeverhalten der Tumorzellen zeigte sich dabei sehr variabel in den verschiedenen ausgewerteten Schnitten: In drei Präparaten konnte eine regelmäßige zytosolische Anfärbung von mäßiger Farbintensität in den neoplastischen Zellen verzeichnet werden. Weitere vier Präparate wiesen neben einer zytosolischen Anfärbung mit variierender Farbintensität in einigen Zellarealen auch weite Tumorbereiche ohne Anfärbung auf. In zwei Präparaten konnte beobachtet werden, dass die Tumorzellen sich mit zunehmendem Stadium der Entartung geringer anfärbt bis ungefärbt und somit SST4-negativ darstellten.

Bei einer Spannweite der IRS-Werte von 0 bis 8 konnte ein gemittelter Score von 3,06 errechnet werden (Tabelle 3).

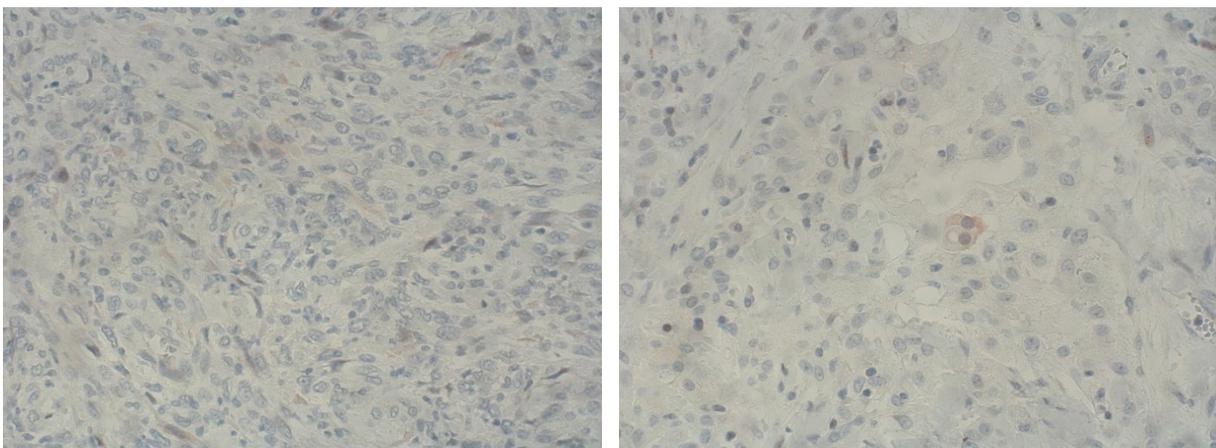


Abbildung 31: SST4-Expression im anaplastischen Schilddrüsenkarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.11. Pankreaskarzinom

Von den 11 ausgewerteten Präparaten des Pankreaskarzinoms wurden 10 als SST4-positiv gewertet (Tabelle 3).

Die Anfärbung der Präparate zeigte sich sowohl membranständig als auch zytosolisch in den rudimentären Azini aus Tumorzellen. Dabei wiesen einige Tumorregionen eine deutliche SST4-Expression in den Pseudoazini auf, während andere Regionen des gleichen Tumors eine deutlich geringere bis keine Anfärbung der Azini zeigten. In drei Tumorpräparaten konnten zudem gleichmäßig im Gewebe verteilte SST4-positive Zellen beobachtet werden, welche keinen Pseudoazini anzugehören schienen. Das von den Tumorzellen gebildete Stroma war durchweg SST4-negativ.

Der Minimalwert in den Pankreaskarzinom-Präparaten betrug 2, der Maximalwert 9. Die Auswertung des gemittelten IRS ergab einen Wert von 6,27 (Tabelle 3).

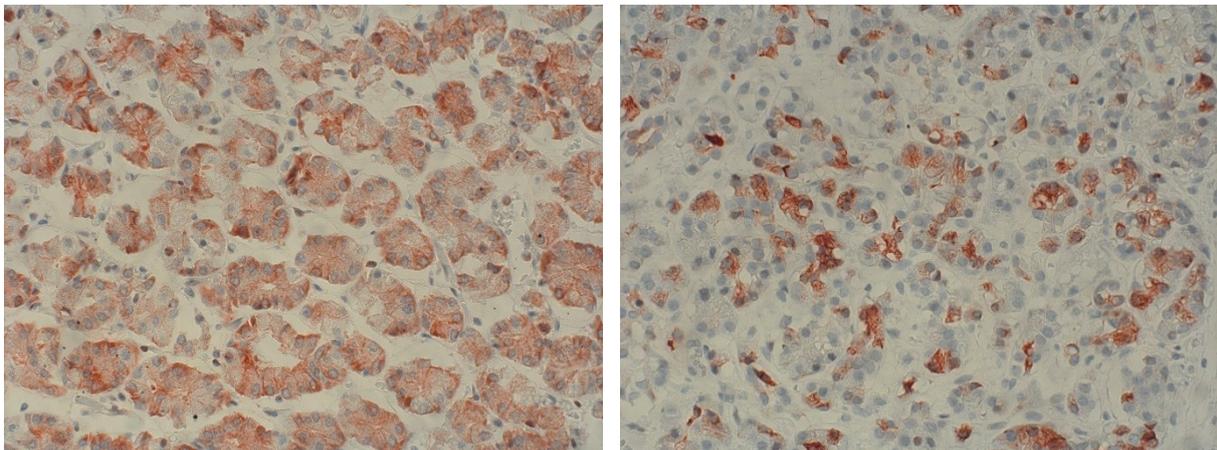


Abbildung 32: SST4-Expression im Pankreaskarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.12. Cholangiozelluläres Karzinom (CCC)

Die neun Tumorpräparate der cholangiozellulären Karzinome zeigten eine extrem hohe Variabilität bezüglich ihrer SST4-Expression (Abbildung 33). Drei Präparate waren komplett SST4-negativ. Ihnen wurde der Minimalwert von 0 zugeordnet. Drei weitere Präparate zeigten eine nur zarte zytosolische Anfärbung der Tumorzellen und wurden ebenfalls als insgesamt SST4-negativ gewertet. Die drei SST4-positiven Präparate wiesen hingegen eine äußerst intensive zytosolische und membranständige Anfärbung in den noch gut differenzierten Tumorarealen auf (Abbildung 33 links). Das Tumorstroma in diesen Präparaten präsentierte sich dabei als SST4-negativ.

Der Maximalwert von 12 Punkten wurde an eines der CCC-Präparate vergeben. Der gemittelte IRS der cholangiozellulären Karzinome lag bei 3,70 (Tabelle 3).

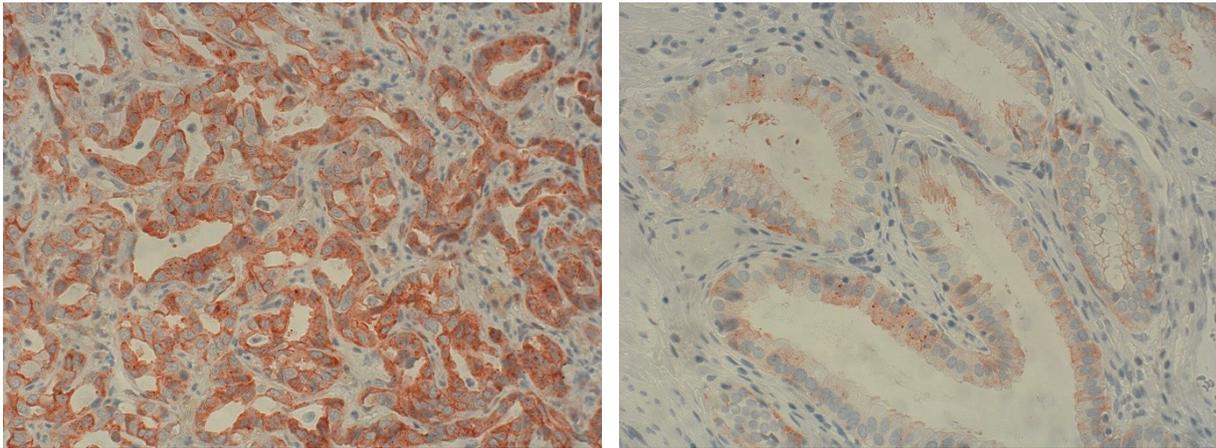


Abbildung 33: SST4-Expression im cholangiozellulären Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.13. Hepatozelluläres Karzinom (HCC)

Von den insgesamt 11 ausgewerteten Tumorpräparaten des hepatozellulären Karzinoms wurden drei als SST4-positiv eingestuft (Tabelle 3). Die Anfärbung in diesen Präparaten trat gruppiert in bestimmten Tumorregionen auf und präsentierte sich dort sowohl zytosolisch als auch membranständig. Benachbarte Tumorregionen imponierten weitestgehend ungefärbt (Abbildung 34).

Nur eines der SST4-positiven Präparate wurde mit dem Maximalwert von 6 bewertet. Der Minimalwert von 0 wurde vier Mal vergeben. Der Berechnung des IRS-Mittelwertes ergab für das HCC einen Wert von 1,55 (Tabelle 3).

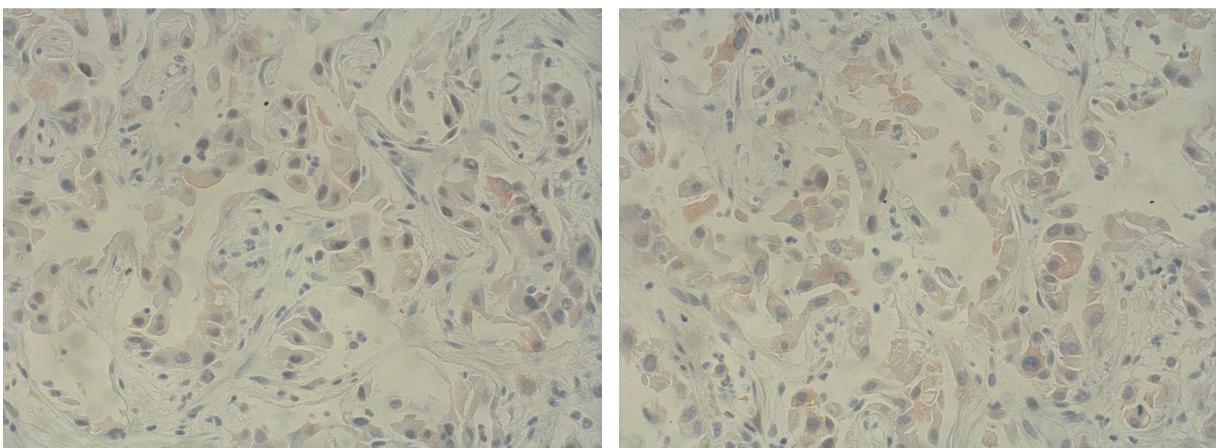


Abbildung 34: SST4-Expression im hepatozellulären Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.14. Phäochromozytom

Die sieben Phäochromozytom-Präparate zeigten sich allesamt SST4-positiv (Tabelle 3). Dabei waren die Proliferationsfronten der Tumore meist deutlich zytosolisch, in einigen Bereichen auch leicht membranständig angefärbt. Das Tumorrinnere zeigte sich in allen Präparaten ohne Anfärbung und somit SST4-negativ.

Es wurde ein minimaler IRS von 4, ein maximaler IRS von 10,5 und ein gemittelter IRS von 6,50 vergeben (Tabelle 3).

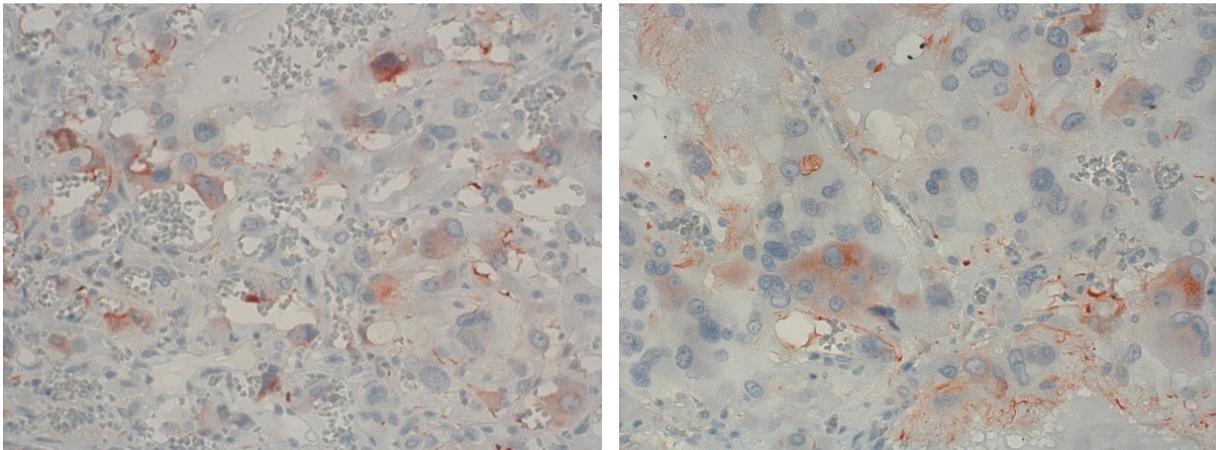


Abbildung 35: SST4-Expression im Phäochromozytom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.15. Klarzelliges Nierenkarzinom

Alle acht Tumorpräparate des klarzelligen Nierenkarzinoms wurden als SST4-negativ gewertet, wobei sich fünf Schnitte komplett ohne Anfärbung und drei mit einer schwachen zytosolischen Anfärbung einzelner Zellen präsentierten. Die vergebenen IRS-Werte reichten von 0 bis 2, der gemittelte IRS betrug 0,63 (Tabelle 3).

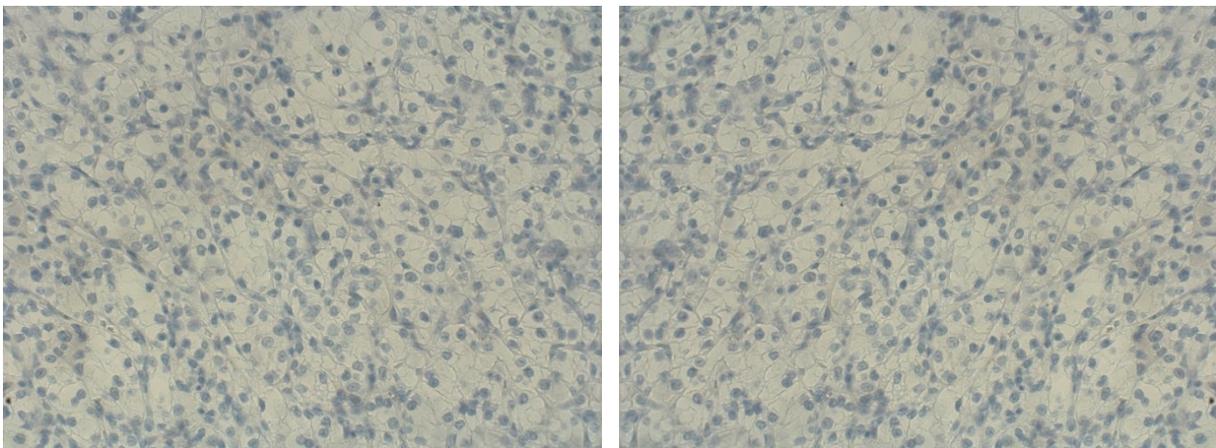


Abbildung 36: SST4-Expression im klarzelligen Nierenkarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.16. Harnblasenkarzinom

Von den sieben Harnblasenkarzinom-Präparaten wurden sechs als SST4-positiv gewertet. Die Färbung der Tumorzellen trat in einem Großteil der Präparate gruppiert, in nur einem Schnitt gleichmäßig im Tumorgewebe verteilt auf. Bei drei Präparaten konnte beobachtet werden, dass die Anfärbung der Zellen zum Tumorrinneren hin und mit dem Entdifferenzierungsgrad der Tumorzellen abnahm.

Es wurde einmal ein minimaler IRS von 2 und einmal ein maximaler IRS von 7,5 vergeben. Der errechnete IRS-Mittelwert betrug 4,68.

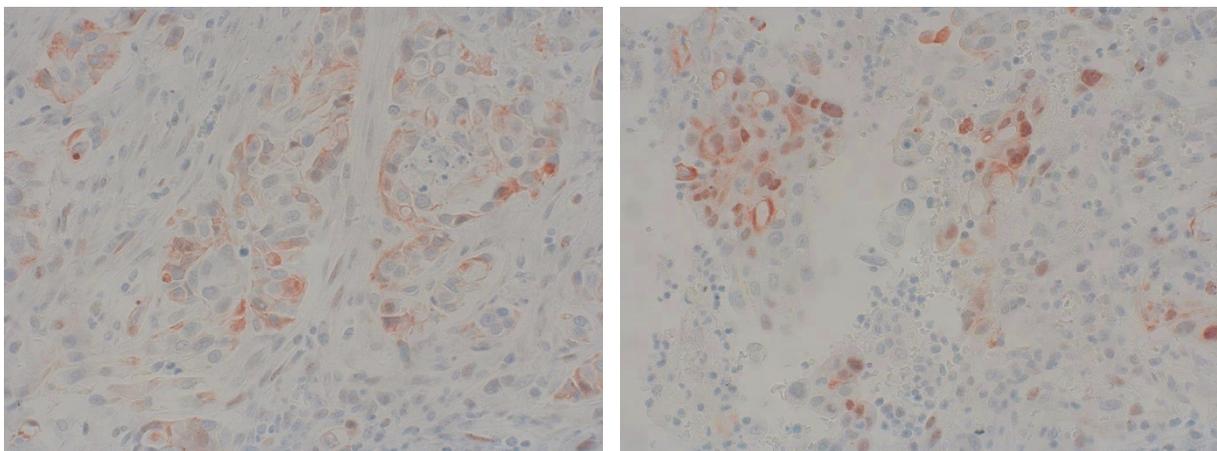


Abbildung 37: SST4-Expression im Harnblasenkarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.17. Magenkarzinom

Alle neun Präparate von Magenkarzinomen wurden als SST4-positiv gewertet. Die Anfärbung der Tumorzellen zeigte sich dabei vorwiegend zytoplasmatisch, teilweise auch membranständig. Innerhalb der Präparate konnten meist unterschiedliche Farbintensitäten in verschiedenen Tumorbereichen verzeichnet werden. Dabei waren in sechs Präparaten mehr als 80% der Zellen und nur in zwei Präparaten weniger als 50% der Tumorzellen angefärbt. Der einmal vergebene minimale IRS betrug 4,5, der viermal vergebene maximale IRS 10. Es wurde ein gemittelter IRS-Wert von 8,06 errechnet.

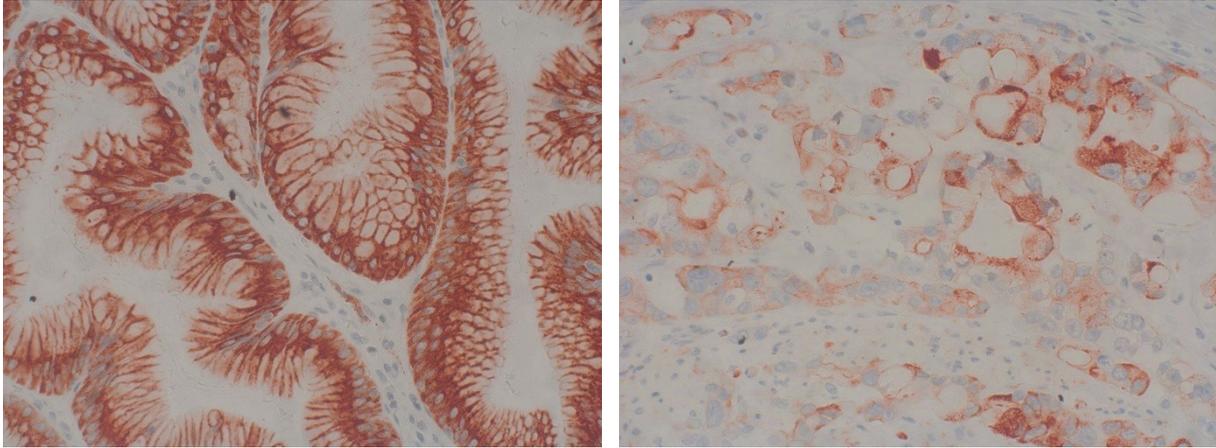


Abbildung 38: SST4-Expression im Magenkarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.18. Kolonkarzinom

Es wurden insgesamt neun Präparate von Kolonkarzinomen ausgewertet, von denen sechs als SST4-positiv bewertet wurden (Tabelle 3). Allen Präparaten gemeinsam waren weite Tumorbereiche ohne jegliche Anfärbung. In vielen Präparaten präsentierten sich gewisse Regionen des Tumors sowohl mit zytosolischer als auch mit einer deutlich membranständiger Anfärbung in einigen Tumorzellen (Abbildung 39).

Der bei einem Präparat vergebene Minimalwert betrug 1, der Maximalwert von 9 wurde ebenfalls bei nur einem Präparat erreicht. Insgesamt ergab sich für das Kolonkarzinom ein gemittelter IRS von 3,70 (Tabelle 3).

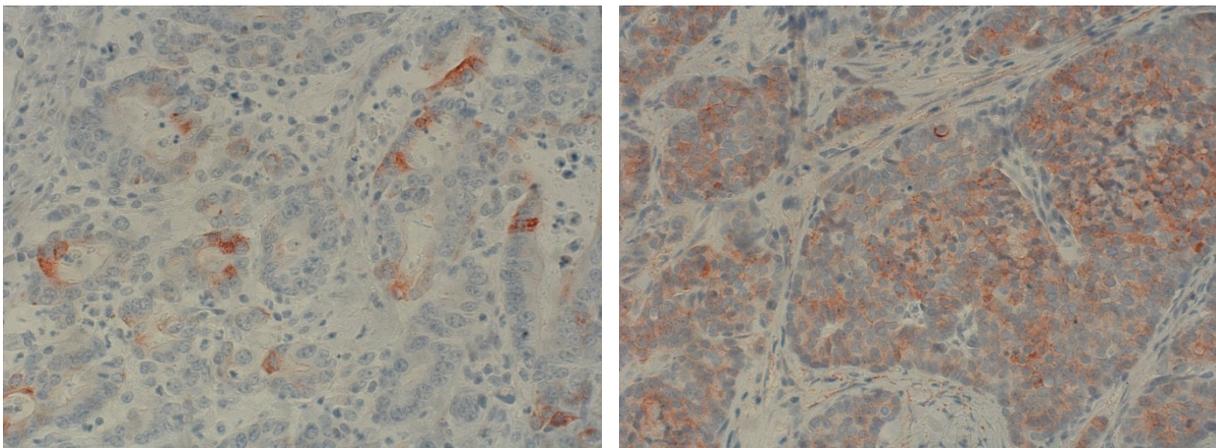


Abbildung 39: SST4-Expression im Kolon-Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.19. Gastrointestinaler Stromatumor (GIST)

Die insgesamt zehn ausgewerteten Präparate von Gastrointestinalen Stromatumoren zeigten sehr unterschiedliche Färbeverhalten. In allen Schnitten konnte die Anfärbung als rein zytosolisch beobachtet werden. Die Farbintensität in den verschiedenen Präparaten variierte von schwach bis intensiv. Während in einigen Präparaten im gesamten Tumorgewebe verstreute Zellen angefärbt waren, zeigten andere Präparate eine klare Anfärbung der äußeren Wachstumszone bei negativem Tumorrinneren. Wieder andere Präparate präsentierten angefärbte Zellgruppen bei komplett ungefärbten Nachbarregionen.

Der zweimal vergebene Minimalwert betrug 0, der einmal vergebene Maximalwert lag bei 10. Insgesamt konnte für die Gastrointestinalen Stromatumore ein mittlerer IRS von 5,03 errechnet werden (Tabelle 3).

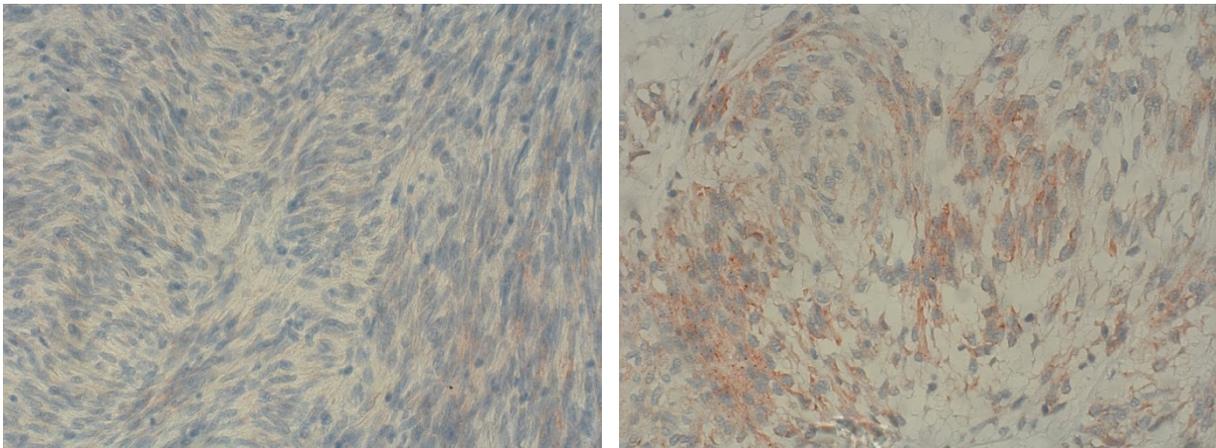


Abbildung 40: SST4-Expression im Gastrointestinalen Stromatumor. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.20. Mammakarzinom

Sechs der neun Mammakarzinom-Präparate wurden als SST4-positiv bewertet (Tabelle 3). In den Präparaten zeigte sich eine zytosolische Anfärbung der lobulär und duktal wachsenden Tumoranteile in den Randzonen und Wachstumsstraßen des Tumors. Weite Teile im Tumorrinneren der Präparate sowie die deutlich entarteten Anteile der Tumore zeigten sich SST4-negativ.

Die vergebenen IRS-Werte reichten von 0 bis 6,25. Der Mittelwert lag bei 3,47 (Tabelle 3).

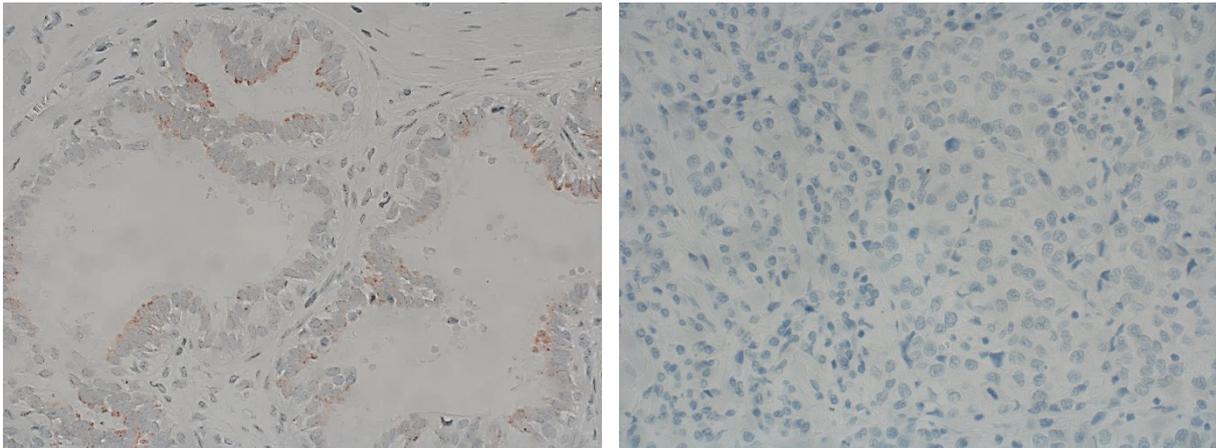


Abbildung 41: SST4-Expression im Mammakarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.21. Ovarialkarzinom

Von den neun ausgewerteten Tumorpräparaten des Ovarialkarzinoms zeigten sich drei Schnitte SST4-positiv. Bei den zwei Präparaten, welche mit dem Maximalwert von 7,5 bewertet wurden (Tabelle 3), zeigte sich eine deutliche membranständige und zytosolische Färbung in den adenomatös wachsenden Tumorzellen (Abbildung 42). Das angrenzende Stroma stellte sich weitestgehend als SST4-negativ oder mit teilweise zarter zytosolischer Anfärbung dar.

Die als SST4-negativ bewerteten Präparate zeigten eine nur geringe zytosolische Anfärbung in einigen Tumorzellen. Zweimal wurde der Minimalwert von 0 vergeben (Tabelle 3).

Der gemittelte IRS betrug 2,55 (Tabelle 3).

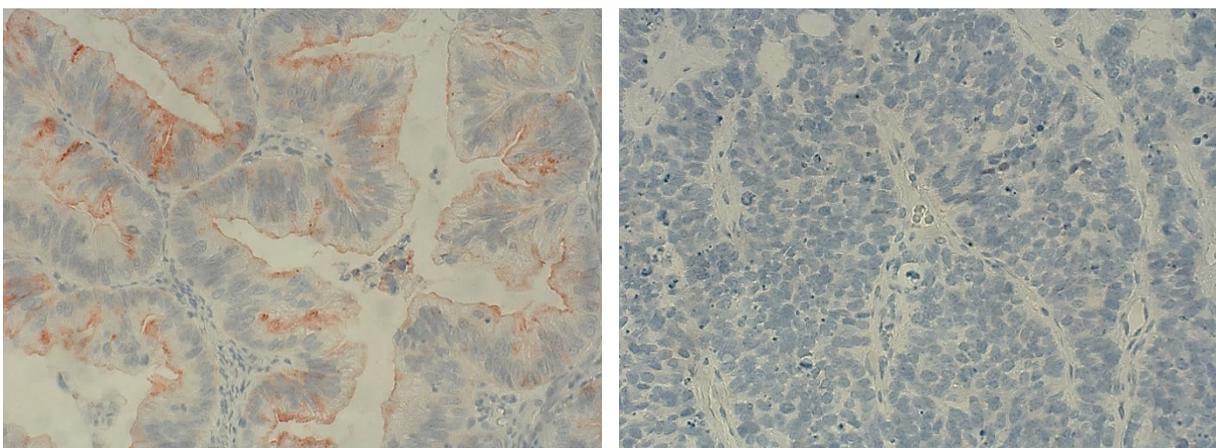


Abbildung 42: SST4-Expression im Ovarialkarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.22. Endometriumkarzinom

Bei zwei der zehn ausgewerteten Endometriumkarzinom-Präparate waren zytosolische Färbungen in einigen entarteten Drüsenzellen zu beobachten (Abbildung 43 rechts). In den restlichen acht Schnitten war keine bis maximal eine sehr zarte zytosolische Anfärbung weniger verstreuter Zellen zu sehen.

Der gemittelte IRS betrug hier 1,53. Der Minimalwert lag bei 0, der Maximalwert bei 4,5 (Tabelle 3).

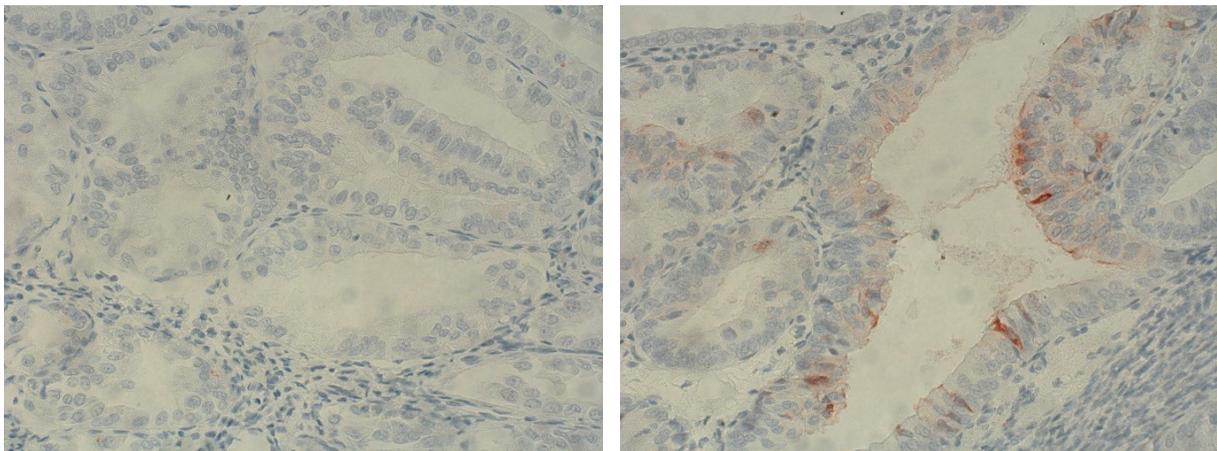


Abbildung 43: SST4-Expression im Endometriumkarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.23. Zervixkarzinom

Drei der neun Zervixkarzinom-Präparate wurden als SST4-positiv gewertet. Die zytosolische Anfärbung einzelner Zellen in diesen drei Präparaten war teils in gebündelter Form in einigen Regionen zu beobachten, teils jedoch auch verstreut im ganzen Tumorbereich vorkommend. Vier Präparate zeigten sich gänzlich SST4-negativ (Abbildung 44).

Es wurde ein gemittelter IRS-Wert von 1,40 errechnet. Der Minimalwert lag bei 0, der Maximalwert bei 4,5 (Tabelle 3).

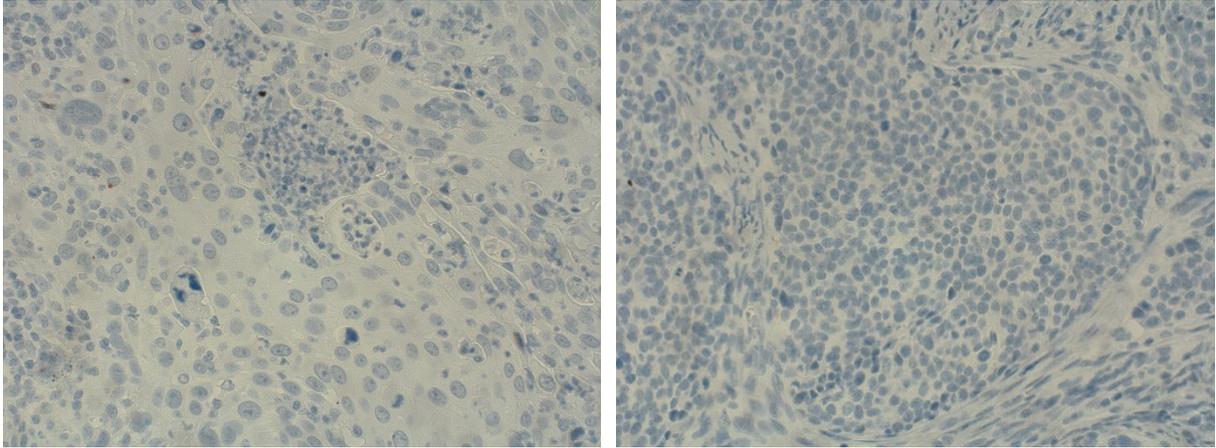


Abbildung 44: SST4-Expression im Zervixkarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.24. Prostatakarzinom

Die zwölf ausgewerteten Präparate des Prostatakarzinoms wiesen ein sehr unterschiedliches Anfärbe-Verhalten auf: Während sechs Präparate komplett SST4-negativ waren und den IRS-Minimalwert von 0 erhielten, zeigten vier Präparate eine mäßige bis starke zytosolische Anfärbung in einigen Zellen des kubischen Epithels der Außenzone des Tumors sowie teilweise auch in Zellen des Tumorstromas (Abbildung 45). Das Tumorrinnere sowie zusätzlich weitere große Tumorbereiche in diesen vier Präparate waren dagegen SST4-negativ (Abbildung 45, rechts).

In den verbliebenen zwei Prostatakarzinom-Präparaten wurde eine mäßig bis stark ausgeprägte zytosolische Anfärbung sowohl am Tumorrand als auch, mit etwas verminderter Intensität, im Tumorrinneren beobachtet. Eher schwach bis nicht angefärbte Regionen fanden sich jedoch auch in diesen Präparaten, die beide mit dem Maximalwert von 7,5 bewertet wurden (Abbildung 45, links).

Die Berechnung des gemittelten IRS-Werts der Prostatakarzinome ergab 2,20 (Tabelle 3).

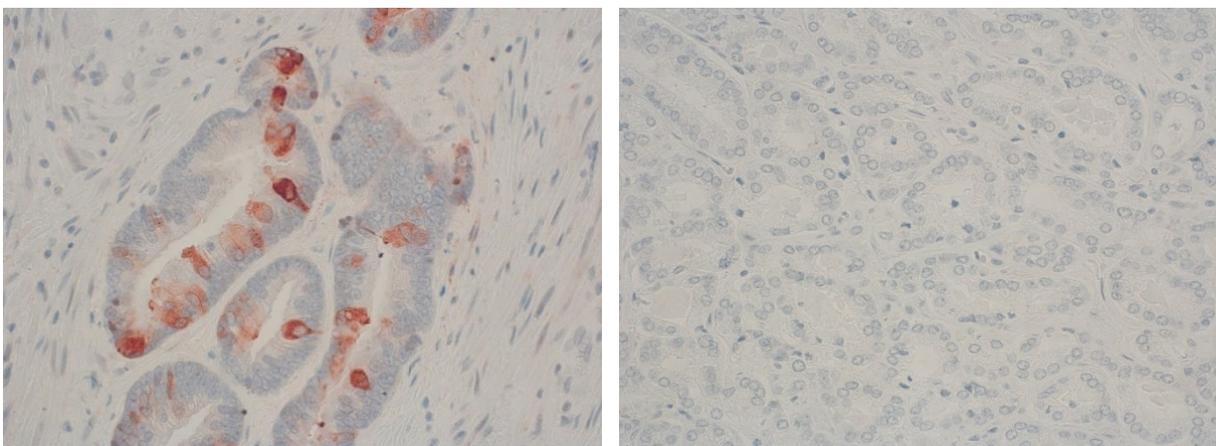


Abbildung 45: SST4-Expression im Prostatakarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. **Links:** Deutliche zytosolische Anfärbung adenomatös wachsender Tumorzellen des Prostata-Karzinoms. **Rechts:** SST4-negatives Prostata-Tumorgewebe.

5.1.2.25. Hodentumor

Die zwölf ausgewerteten Hodenkarzinom-Präparate zeigten eine große Variabilität in ihrer SST4-Expression. Nur zwei Präparate wurden als SST4-negativ und mit dem Minimalwert von 0 bewertet. Ebenfalls zwei Präparate zeigten eine mäßige bis intensive zytosolische Anfärbung in mehr als 50 Prozent ihrer Zellen und wurden mit dem Maximalwert von 7,5 bewertet (Tabelle 3). In den anderen acht Präparaten traten zytosolische Anfärbungen teilweise in der Randzone des Tumors, teils verstreut im Präparat, zusammenliegend in Tumorzellnestern (Abbildung 46) oder in einer Tumor-Wachstumsstraße, auf. Auch innerhalb eines Präparates konnten nebeneinander verschiedene Färbeverhalten beobachtet werden. In den meisten Präparaten waren zudem weite Tumorbereiche ohne jegliche Anfärbung geblieben. Der gemittelte IRS der Hodentumore lag bei 3,60 (Tabelle 3).

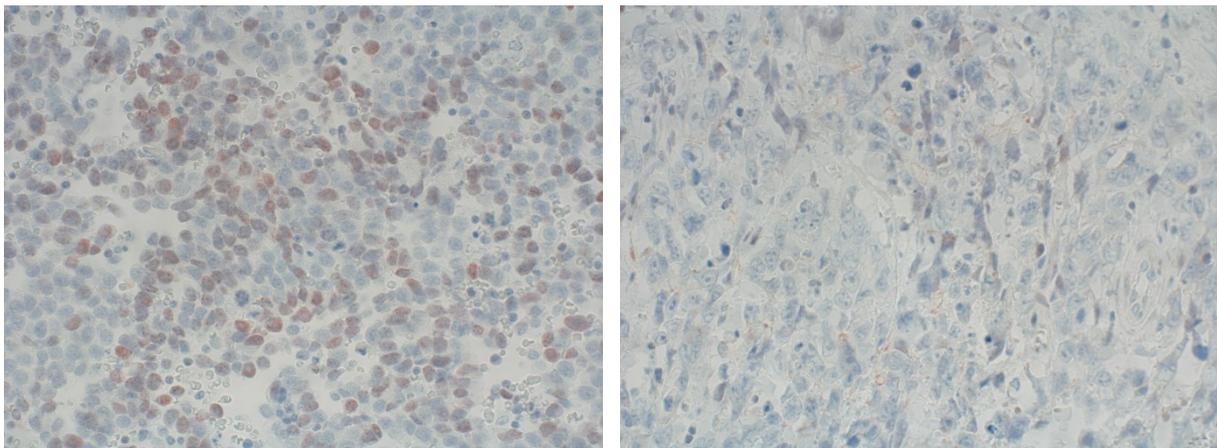


Abbildung 46: SST4-Expression im Hodenkarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.26. Lymphom

Die zwölf Lymphom-Präparate zeigten allesamt eine zytosolische Anfärbung der Tumorzellen, wobei die Anzahl der gefärbten Zellen sowie die Intensität dieser Anfärbung sehr unterschiedlich waren. Hierbei konnte eine sehr ausgeprägte Anfärbung der Zellen an den Lymphom-Rändern beobachtet werden, die zum Zentrum hin jedoch meist abnahm oder gänzlich verschwand. Nur zwei Präparate zeigten ein gleichmäßiges Immunsignal in allen Tumorbereichen inklusive des Tumorzentrums. Die Farbintensität in den Präparaten reichte von zart bis intensiv (Abbildung 47).

Zehn der zwölf Präparate wurden letztlich als SST4-positiv gewertet. Der Minimalwert von 1,5 wurde ein Mal vergeben, der Maximalwert von 10 hingegen bei zwei Präparaten. Der gemittelte IRS betrug 6,02 (Tabelle 3).

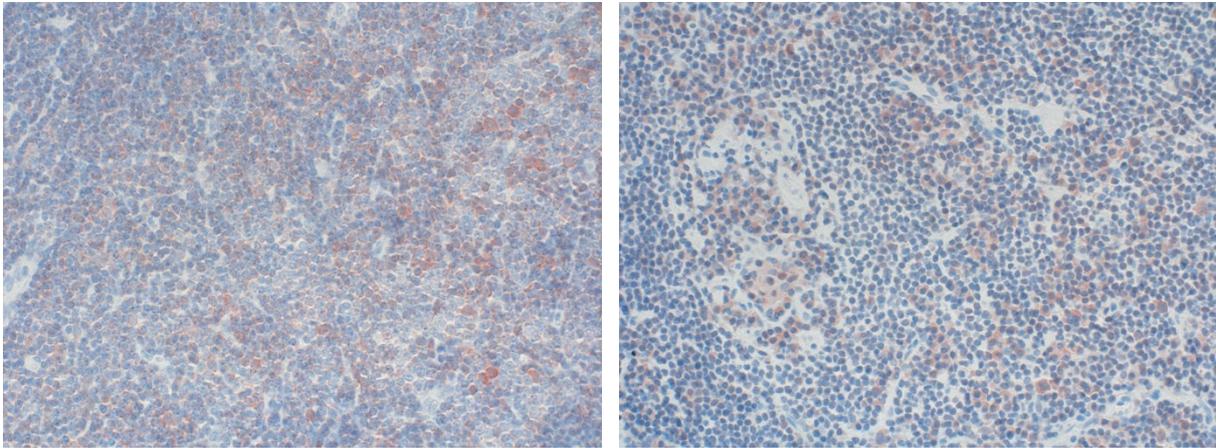


Abbildung 47: SST4-Expression im Lymphom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.27. Malignes Melanom

In den fünf ausgewerteten Präparaten des Malignen Melanoms wurde sowohl eine zytosolische und als auch eine membranständige SST4-Expression in den Zellen der Proliferationszonen beobachtet. Eine vorwiegend zytosolische Anfärbung fand sich außerdem in einigen Zellen der Wachstumsstraßen des Tumors (Abbildung 48). Die melanomtypischen Zellnester, hingegen, zeigten sich in den Präparaten SST4-negativ.

Drei der insgesamt 5 Präparate des Malignen Melanoms wurden als SST4-positiv gewertet. Der Minimalwert von 1 wurde ebenso wie der Maximalwert von 6 nur ein Mal vergeben. Der gemittelte IRS wurde mit 3,20 berechnet (Tabelle 3).

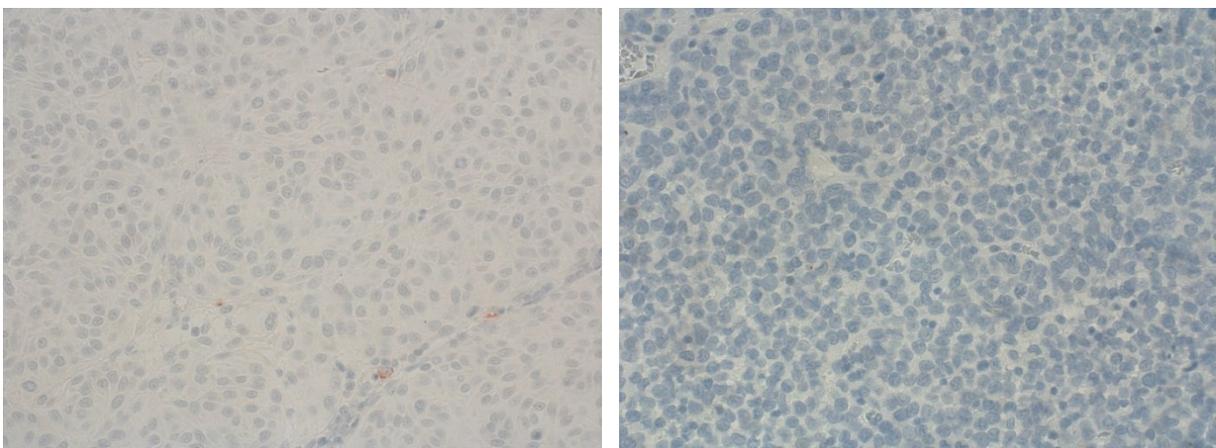


Abbildung 48: SST4-Expression im Malignen Melanom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.2. Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse in den humanen Tumorgeweben

In der folgenden Tabelle 3 sind die Ergebnisse der immunhistochemische Auswertung der humanen Tumorgewebe noch einmal zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3: Auswertung der immunhistochemischen SST4-Färbung an humanen Tumorgeweben mit Hilfe des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner (IRS). Die IRS-Mittelwerte der jeweiligen Tumorgewebe sind ab einem Wert von größer 3 rot und fett hervorgehoben.

Tumorentität	Positive Präparate	Mittelwert	Minimalwert	Maximalwert
Glioblastom	9/9	6,78	4,5	9
Hypophysenadenom	1/2	5,00	0	10
Adenokarzinom der Lunge	9/12	4,50	0	9
Plattenepithelkarzinom der Lunge	0/10	0,68	0	2
kleinzelliges Bronchialkarzinom	1/9	0,78	0	5
Nebenschilddrüsen-Adenom	10/10	9,35	3	12
Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	3/10	2,30	0	7,5
Papilläres Schilddrüsenkarzinom	5/11	2,05	0	5
Medulläres Schilddrüsenkarzinom	6/7	5,18	0	9
Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom	4/8	3,06	0	8
Pankreaskarzinom	10/11	6,27	2	9
Cholangiozelluläres Karzinom	3/9	3,70	0	12
Hepatozelluläres Karzinom	3/11	1,55	0	6
Phäochromozytom	7/7	6,50	4	10,5
Klarzelliges Nierenkarzinom	0/8	0,63	0	2
Harnblasenkarzinom	6/7	4,68	2	7,5
Magenkarzinom	9/9	8,06	4,5	10

Kolonkarzinom	6/9	3,70	1	9
Gastrointestinaler Stromatumor	8/10	5,03	0	10
Mammakarzinom	6/9	3,47	0	6,25
Ovarialkarzinom	3/9	2,56	0	7,5
Endometriumkarzinom	2/10	1,53	0	4,5
Cervixkarzinom	3/9	1,40	0	4,5
Prostatakarzinom	5/12	2,20	0	7,5
Hodenkarzinom	8/12	3,60	0	7,5
Lymphom	10/12	6,02	1,5	10
Malignes Melanom	3/5	3,20	1	6

5.3. Immunhistochemische Untersuchung der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression in humanen bronchopulmonalen und gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien

Die Analyse der SST4-Expression in humanen neuroendokrinen Tumoren erfolgte an einer Serie von insgesamt 768 Präparaten von 295 Patienten. Da in einigen der zur Verfügung gestellten Proben kein Tumor nachgewiesen werden konnte, gingen nur die Präparate von 274 der 295 Patienten in die Auswertung ein. Da von einigen Patienten mehrere Proben vorhanden waren, wurden die SST4-IRS-Werte der Proben pro Patient für die weiterführende statistische Analyse gemittelt, so dass jeweils nur ein SST4-IRS-Wert pro Patient vorlag.

5.3.1. Allgemeine Patientendaten

In Bezug auf das Geschlecht standen die Daten von 269 Patienten zu Verfügung, von welchen 144 männlich und 125 weiblich waren.

In die Auswertung der Altersverteilung konnten die Daten von 259 Patienten einbezogen werden. Hierbei ergab sich ein durchschnittliches Alter von 58,5 Jahren. Der Median lag bei 59,7 Jahren. Der jüngste Patient war 12,1 Jahre, der älteste 83,9 Jahre alt. Die Standardabweichung betrug 12,9 Jahre.

Für die Auswertung des Gesamtüberlebens lagen Daten von 85 Patienten vor. Hier ergab sich ein Mittelwert von 43,3 Monaten. Der Median lag bei 27,9 Monaten. Der Minimalwert betrug 0,1 Monate, der Maximalwert 351 Monate.

5.3.2. Klinische Daten

5.3.2.1. Tumorentität und Primärtumorlokalisation

Das folgende Diagramm gibt einen Überblick über die Verteilung der im Rahmen dieser Arbeit ausgewerteten neuroendokrinen Neoplasien auf die verschiedenen Primärtumorlokalisationen bzw. Tumorentitäten:

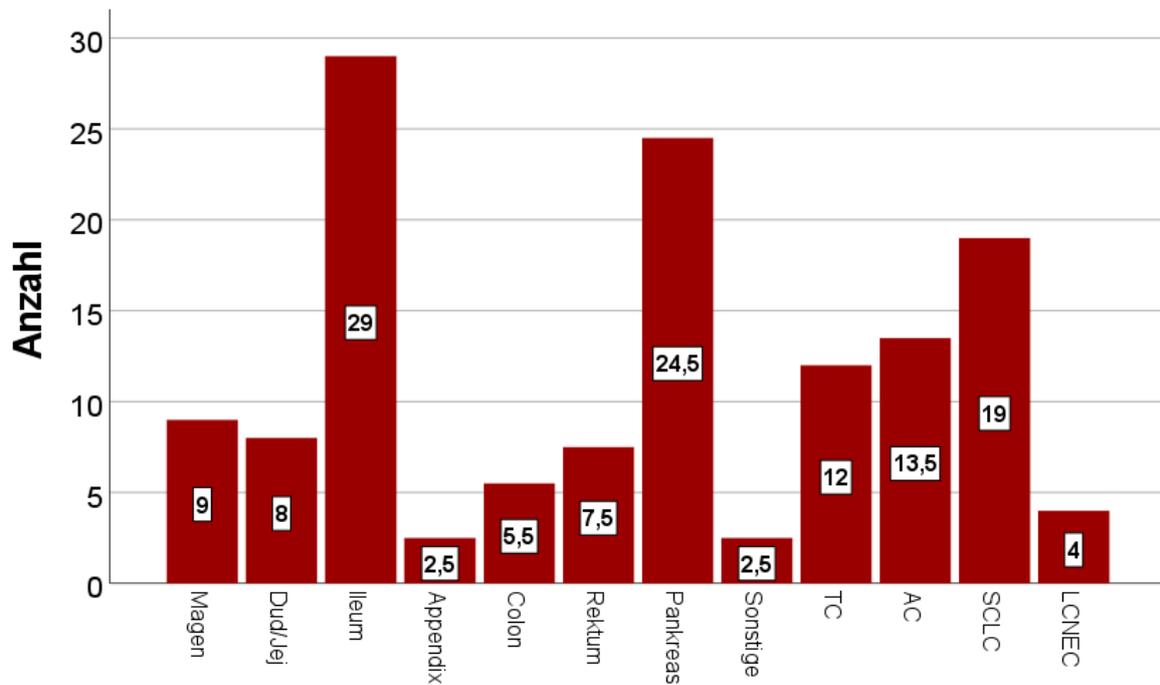


Abbildung 49: Aufteilung der untersuchten neuroendokrinen Neoplasien auf die verschiedenen Tumorentitäten und Primärtumorkalisationen. Dud: Duodenum; Jej: Jejunum; TC: Typisches Karzinoid; AC: Atypisches Karzinoid; SCLC: kleinzelliges Bronchialkarzinom; LCNEC: großzelliges neuroendokrines Karzinom der Lunge.

5.3.2.2. TNM-Stadien, Staging und Grading

Bei der Betrachtung der Häufigkeitsverteilung der TNM-Stadien sowie des Stagings der analysierten neuroendokrinen Neoplasien ist zu berücksichtigen, dass die kleinzelligen Bronchialkarzinome im klinischen Setting alternativ in die therapieentscheidenden Stadien VLD (Very-Limited-Disease), LD (Limited-Disease) und ED (Extensive-Disease) eingeteilt werden und nicht entsprechend der TNM-Klassifikation und dem Staging. Die so eingeteilten Tumore konnten daher nicht in die Statistik zur TNM-Klassifikation einfließen. Hingegen wird bei den kleinzelligen Tumoren ebenfalls eine Grading-Einstufung vorgenommen.

T-Stadium

175 neuroendokrine Neoplasien konnten bei der Auswertung der Häufigkeitsverteilung des T-Stadiums berücksichtigt werden, da hier die entsprechenden Daten verfügbar waren. Es ergab sich ein T1-Stadium für 47 (26,9%), ein T2-Stadium für 46 (26,3%), ein T3-Stadium für 58 (33,1%) und ein T4-Stadium für 24 (13,7%) aller hierbei statistisch ausgewerteten neuroendokrinen Neoplasien.

N-Stadium

Die N-Stadien von 207 neuroendokrinen Neoplasien konnten ausgewertet werden. Es ergab sich ein Lymphknoten-negatives N0-Stadium für 84 (40,6%) und ein Lymphknoten-positives N1-Stadium für 123 (59,4%) Tumore.

M-Stadium

Das M-Stadium war für 203 der neuroendokrinen Neoplasien bekannt. Ein Metastasen-freies M0-Stadium lag hierbei in 89 (43,8%) und ein M1-Stadium in 114 (56,2%) Fällen vor.

Staging

Von insgesamt 156 der neuroendokrinen Neoplasien konnte das Staging ausgewertet werden. 19 (12,2%) dieser NEN befanden sich im Stadium 1, 12 (7,7%) im Stadium 2, 23 (14,7%) im Stadium 3 und 102 (65,4%) im Stadium 4.

Grading

Für 269 neuroendokrine Tumore lagen Angaben zum Grading vor. Es ergab sich eine G1-Histologie in 108 (40,1%), ein G2-Grading in 86 (32,0%) und eine G3-Histologie in 75 (27,9%) der Fälle.

5.3.2.3. Somatostatin-Rezeptor-4-Expressionsprofil

Für die neuroendokrinen Neoplasien konnte eine sehr hohe Variabilität in Bezug auf die SST4-Expression beobachtet werden. Zu einem überwiegenden Anteil lag der SST4 zytoplasmatisch, in wenigen Exemplaren sowohl der GP-NEN als auch der BP-NEN zusätzlich auch membranständig vor. Während in einigen Tumoren nur einzelne Zellen eine Anfärbung aufwiesen, konnte in anderen Präparaten ein Immunsignal in ganzen Zellgruppen beobachtet werden. Der SST4 wurde vor allem in den Randzonen der Tumore exprimiert, wohingegen das Tumoriinnere oft kein Immunsignal zeigte. Insgesamt ergab sich für die NEN ein IRS-Mittelwert von 2,3 und ein IRS-Median von 1,5. Der Minimalwert von 0 wurde in 36,8% der Fälle vergeben, der Maximalwert von 12 hingegen in nur 0,3% der Fälle.

Demzufolge exprimieren die neuroendokrinen Neoplasien den SST4 im Vergleich zu anderen Tumorentitäten insgesamt eher in einem geringeren Umfang.

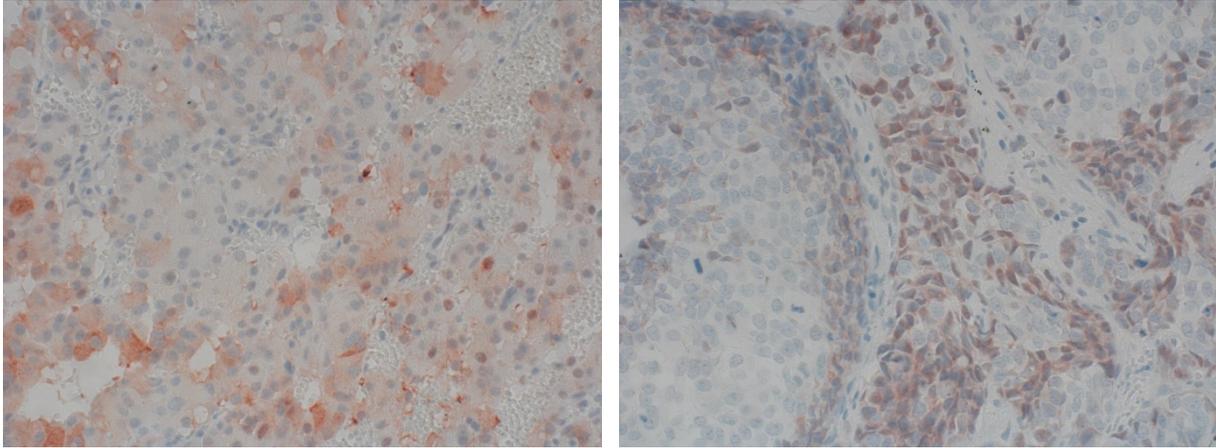


Abbildung 50: SST4-Expression in gastroenteropankreatischen Neoplasien. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

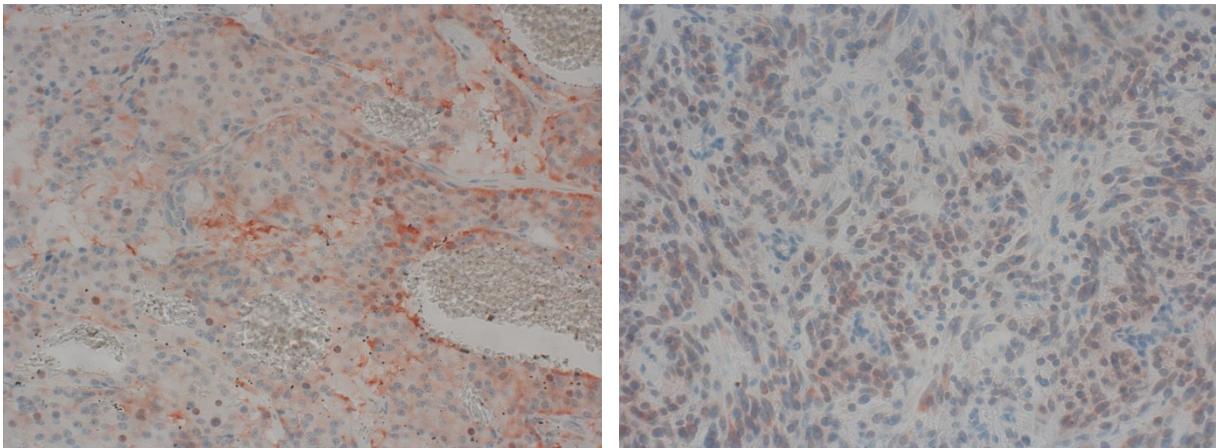


Abbildung 51: SST4-Expression in bronchopulmonalen Neoplasien. Immunhistochemie (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

In die statistische Analyse der SST4-Expression in den verschiedenen neuroendokrinen Neoplasien konnten die Daten von 274 Tumoren einfließen.

Einen Medianwert von größer/gleich drei und somit insgesamt eine als positiv gewertete SST4-Expression konnte in den neuroendokrinen Tumoren des Rektums und des Pankreas, sowie in den typischen (TC) und atypischen Karzinoide (AC) der Lunge verzeichnet werden. Mit einem Medianwert von kleiner drei und folglich als negativ bezüglich eines SST4-Vorkommens zeigten sich die neuroendokrinen Tumore des Magens, des Duodenums/Jejunums, des Ileums, der Appendix und des Colons sowie die kleinzelligen Bronchialkarzinome (SCLC) und die großzelligen neuroendokrinen Lungenkarzinome (LCNEC) (siehe Abbildung 53).

Insgesamt wurde jedoch hinsichtlich der SST4-Expression für alle analysierten neuroendokrinen Tumore eine große Variabilität innerhalb der jeweiligen Tumortyp- bzw. Lokalisations-Gruppen beobachtet (siehe Abbildungen 52 und 53).

Das folgende Balkendiagramm (Abbildung 52) stellt die Anzahl der jeweils als SST4-negativ oder (ab einem IRS von 3) als SST4-positiv gewerteten Tumore dar, aufgedgliedert nach den

verschiedenen untersuchten Primärtumorlokalisationen und Entitäten neuroendokriner Tumore.

Im danach folgenden Box-Plot (Abbildung 53) ist die Verteilung der ermittelten SST4-IRS-Werte für die verschiedenen untersuchten Primärtumorlokalisationen bzw. Tumorentitäten der neuroendokrinen Neoplasien sowie die jeweiligen Medianwerte und das Ausmaß der Streuung der Werte dargestellt.

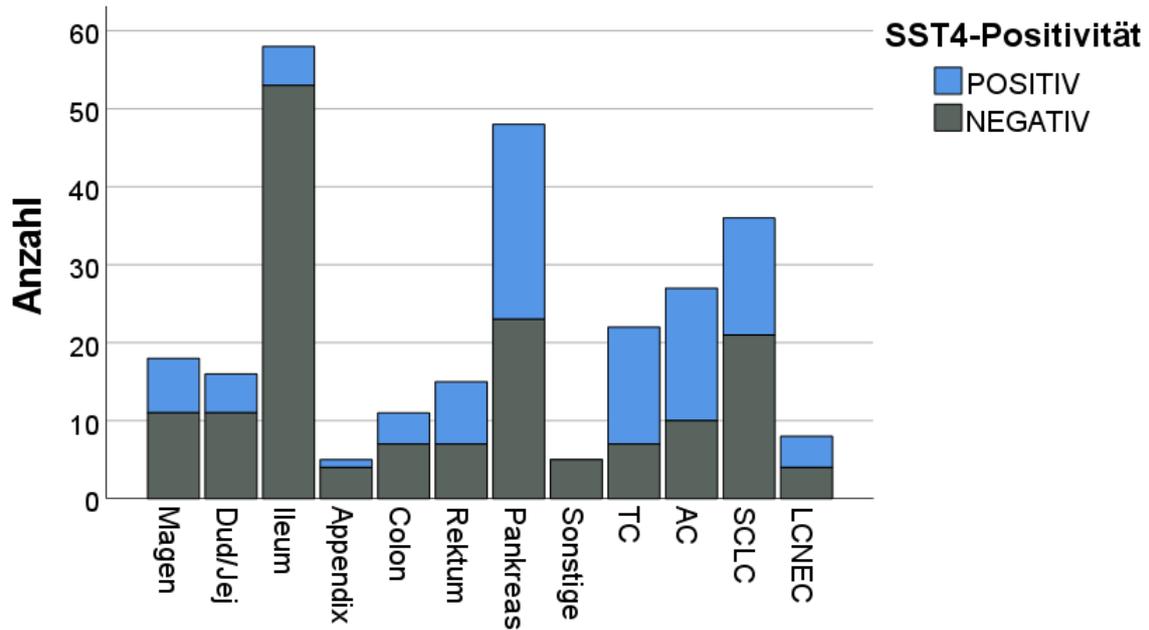


Abbildung 52: Anzahl der als SST4-positiv oder -negativ gewerteten Tumore, aufgegliedert nach den verschiedenen untersuchten Primärtumorlokalisationen und Entitäten neuroendokriner Neoplasien. Dud: Duodenum; Jej: Jejunum; TC: Typisches Karzinoid; AC: Atypisches Karzinoid; SCLC: kleinzelliges Bronchialkarzinom; LCNEC: großzelliges neuroendokrines Karzinom der Lunge.

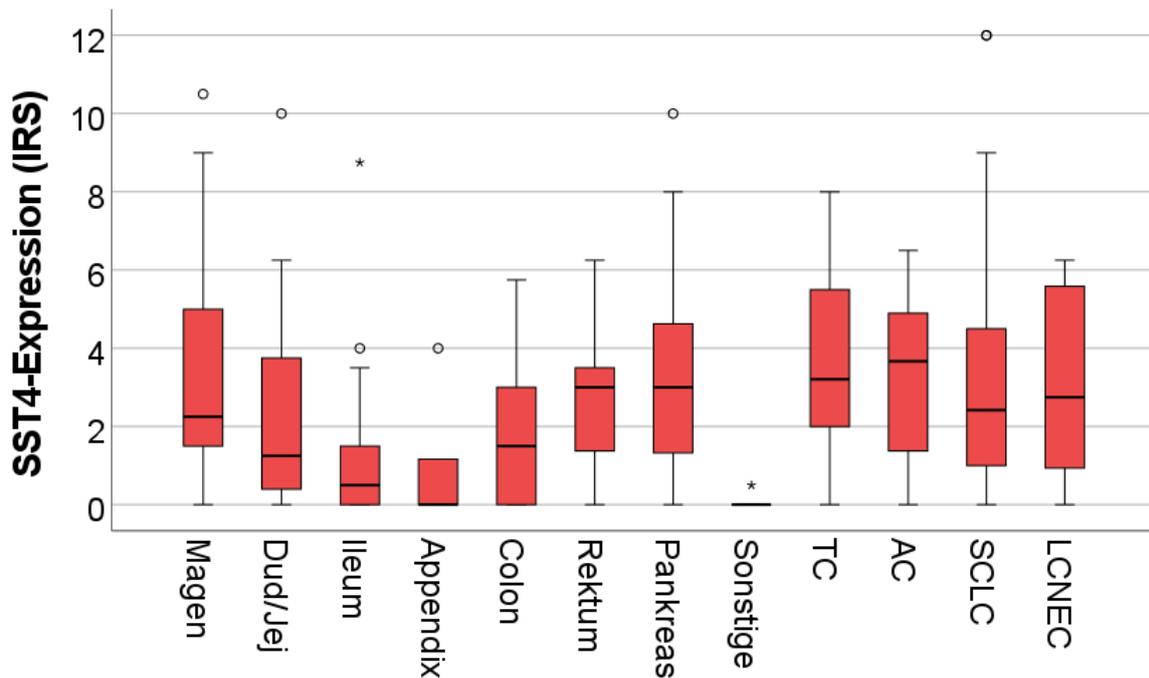


Abbildung 53: Verteilung der für die verschiedenen untersuchten Primärtumorlokalisationen und Entitäten neuroendokriner Neoplasien ermittelten SST4-IRS-Werte. Dargestellt ist der Median, das obere und das untere Quartil, der Minimal- und der Maximalwert sowie Ausreißer (Kreise: doppelte Standardabweichung; Sterne: dreifache Standardabweichung). Dud: Duodenum; Jej: Jejunum; TC: Typisches Karzinoid; AC: Atypisches Karzinoid; SCLC: kleinzelliges Bronchialkarzinom; LCNEC: großzelliges neuroendokrines Karzinom der Lunge .

5.3.3. Somatostatin-Rezeptor-4-Expression und klinische Daten

5.3.3.1. Korrelationsanalysen – alle Tumore

Um mögliche Zusammenhänge zu erfassen, wurden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten SST4-IRS-Werte mit dem Ausmaß der Expression verschiedener Marker, welche für NEN typisch sind und bereits im Rahmen von früheren Arbeiten bestimmt worden waren, korreliert. Diese Marker umfassten den Proliferationsmarker Ki-67, den neuroendokrinen Marker Chromogranin A (CgA), die vier anderen Somatostatin-Rezeptoren SST1, SST2, SST3 und SST5, den Dopamin-D2-Rezeptor, den CXC-Motiv Chemokinrezeptor 4 (CXCR4), den Programmed-death-Liganden 1 (PDL-1), sowie Glukagon, Insulin und SS14/28. Weiterhin wurden die SST4-IRS-Werte mit den Serumkonzentrationen von Chromogranin A und Serotonin korreliert.

Das gut untersuchte nukleäre Protein Ki-67 dient als Marker für die die Eischätzung der Proliferationsrate von Tumorzellen, indem es die Mitose-Rate widerspiegelt (Kloppel und La Rosa 2018).

Chromogranin A (CgA) ist ein Protein, welches von neuroendokrinen Zellen gebildet und auch in die Blutbahn sezerniert wird. Das CgA stellt aufgrund der häufigen falsch positiven Befunde,

die durch andere Erkrankungen, aber auch durch Medikamente hervorgerufen werden können, zwar nur einen unspezifischen Biomarker für neuroendokrine Neoplasien dar, jedoch wird der Serum-CgA-Wert von offiziellen Gesellschaften wie der North American Neuroendocrine Tumor Society (NANETS) und der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) zur Diagnostik und zur postoperativen Verlaufskontrolle bei neuroendokrinen Tumorerkrankungen empfohlen. CgA ist damit der einzige routinemäßig eingesetzte Biomarker für NENs in der klinischen Praxis.

Niedrige bzw. fallende CgA-Werte sind mit einem Ansprechen auf die NEN-Therapie assoziiert, wobei hohe bzw. gleichbleibend-hohe CgA-Werte mit einer schlechteren klinischen Prognose einhergehen. Hohe CgA-Serumwerte sind insgesamt signifikant mit einem höheren Grading und einem schlechteren Überleben korreliert (Wang et al. 2014, Corti et al. 2018, Sansone et al. 2019, Ma et al. 2020).

Serotonin ist ein Monoamin, welches eine wichtige Rolle bei verschiedenen Prozessen und Signalwegen des Körpers spielt. Es wirkt als Mediator vor allem im Gastrointestinaltrakt, aber auch an den Blutgefäßen sowie als Neurotransmitter im Gehirn. Einige NEN des Gastrointestinaltrakts haben die Fähigkeit, Serotonin zu produzieren. Serotonin kann über Serotoninrezeptoren Wachstumsreize bei Tumoren verstärken, wohingegen ein niedriger Serotonin-Spiegel über eine verminderte Durchblutung das Tumorstadium hemmt. Der Einfluss des Serotonins auf die entarteten Zellen ist folglich konzentrationsabhängig und der zugehörige Marker ist der im Serum gemessene Serotonin-Wert, der jedoch in der klinischen Praxis nur bei NENs des Duodenums, Jejunums und Ileums bestimmt wird (Sarrouilhe et al. 2015, Lindstrom et al. 2018).

Eine Überexpression der verschiedenen SST, insbesondere des SST2, in NEN ist durch eine große Anzahl an Studien sehr gut belegt. Dies bildet die molekulare Grundlage für den Einsatz von SSA bei diesen Tumoren. In zahlreichen Arbeiten konnte außerdem ein positiver Zusammenhang zwischen der SST2-Expression und dem Patienten-Outcome gezeigt werden (Colao et al. 2014, Vitale et al. 2018, Mai et al. 2019).

Eine Expression bzw. Überexpression des Dopamin-D2-Rezeptors scheint in einigen NEN parallel zur Überexpression der SST ebenfalls vorzuliegen. Studien zu kombinierten SST-/D2-Analoga-Therapien bei verschiedenen neuroendokrinen Neoplasien kamen bislang allerdings zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen, sodass die Bedeutung der D2-Rezeptor-Expression in dieser Tumorgruppe derzeit noch weiter untersucht und diskutiert wird (Gatto und Hofland 2011, Couvelard et al. 2017).

Chemokine und Chemokinrezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. Das vermehrte Auftreten des CXC-Motiv-Chemokinrezeptors 4 (CXCR4) ist unter anderem mit einer erhöhten Tumorprogression und einem höheren Ki-67-Index, einer verstärkten Invasivität

des Tumors, einer frühzeitigeren Metastasierung sowie einem schlechteren Patienten-Outcome assoziiert (Drury et al. 2011, Kaemmerer et al. 2015b, Mai et al. 2019).

Die Überexpression des Programmed-Cell-Deth-Ligand 1 (PDL-1) verhilft Tumorzellen zu einem erfolgreichen Immun-Escape. Die PDL-1-Expression korreliert in mehreren Tumorentitäten, wie beispielsweise BP-NEN, positiv mit dem Tumor-Grading, dem Ki67-Index und der Expression des CXCR4. Hohe PDL-1-Level gehen erwiesenermaßen in vielen Tumorentitäten mit einem signifikant schlechteren Patienten-Outcome einher. Anti-PD1- oder -PDL-1-Antikörper wie Pembrolizumab oder Nivlizumab kommen bereits in der Behandlung einiger Tumorentitäten zum Einsatz und lieferten in Studien vielversprechende Ergebnisse (Suteau et al. 2020, Farrag et al. 2021, Rosner et al. 2021).

Von einigen neuroendokrinen Neoplasien des Pankreas können auch die Peptide Insulin und Glukagon sezerniert werden. Diese NENs werden dann als Insulinome oder Glukagonome bezeichnet (Hofland et al. 2018, Sansone et al. 2019).

Neuroendokrine Neoplasien mit einer Überproduktion und Sezernierung von Somatostatin-14 bzw. -28 werden als Somatostatinome bezeichnet und kommen sehr selten vor (Sansone et al. 2019).

Bei Betrachtung aller verfügbarer Tumore konnten die in Tabelle 4 dargestellten signifikanten Zusammenhänge ermittelt werden: Eine signifikante positive Korrelation fand sich zwischen der Expression des SST4 und der Expression des Ki-67, des Dopamin-D2-Rezeptors, des SST1 und des SST5, des Chemokinrezeptors CXCR4, des Programmed-Death-Liganden 1 (PDL-1) und des Chromogranin A (CgA). Zwischen der Expression des SST4 und den Serum-Serotonin-Werten zeigte sich hingegen ein negativer Zusammenhang, wobei jedoch zu beachten ist, dass der Serum-Serotonin-Wert ausschließlich bei den 51 Patienten mit einem NEN des Duodenums/Jejunums oder des Ileums bestimmt worden war.

Ebenfalls ein negativer Zusammenhang konnte zwischen der SST4-Expression und dem Gesamtüberleben der verstorbenen Patienten verzeichnet werden (Spearman-Rho-Test: $r = -0,229$, $p = 0,036$). Keine signifikanten Korrelationen konnten dagegen zwischen der SST4-Expression und dem Alter, der Expression des SST2 oder des SST3 sowie der ebenfalls immunhistochemisch ermittelten Expression von Insulin oder Glukagon oder des Somatostatin-14/28 in den Tumoren gefunden werden.

Tabelle 4: Signifikante Korrelationen zwischen der SST4-Expression und verschiedenen Markern für neuroendokrine Neoplasien bei Betrachtung aller zur Verfügung stehenden Tumore.

		IRS SST4
Ki-67-Index	Korrelationskoeffizient:	0,182
	Signifikanz:	0,003
Serotonin-Konzentration (Serum)	Korrelationskoeffizient:	-0,315
	Signifikanz:	0,024
IRS Dopamin-D2-Rezeptor	Korrelationskoeffizient:	0,199
	Signifikanz:	0,002
IRS SST1	Korrelationskoeffizient:	0,268
	Signifikanz:	0,000
IRS SST5	Korrelationskoeffizient:	0,221
	Signifikanz:	0,000
IRS CXCR4	Korrelationskoeffizient:	0,170
	Signifikanz:	0,006
IRS PDL-1	Korrelationskoeffizient:	0,359
	Signifikanz:	0,000
IRS Chromogranin A (CgA)	Korrelationskoeffizient:	0,232
	Signifikanz:	0,000

5.3.3.2. Korrelationsanalysen –gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien

Um eine detailliertere Aussage treffen zu können, wurden anschließend die Daten der Gruppe der gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien getrennt von den bronchopulmonalen und nicht-klassifizierten neuroendokrinen Neoplasien statistisch ausgewertet und auf Korrelationen zwischen der SST4-Expression und den klinischen Daten der Patienten sowie der Expression von für neuroendokrine Tumore typischen Markern hin überprüft.

5.3.3.2.1. Korrelationen zwischen der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression und den klinischen Daten bei gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien

Eine signifikante Korrelation konnte zwischen der SST4-Expression und dem Grading der Tumore ermittelt werden (Spearman-Rho-Test: $r = 0,181$; $p = 0,004$). Ein signifikant negativer

Zusammenhang fand sich dagegen zwischen der SST4-Expression und dem Overall-Survival der verstorbenen Patienten (Spearman-Rho-Test: $r = -0,376$, $p = 0,008$).

Keine signifikante Korrelation konnte zwischen der SST4-Expression in den GEP-NENs und dem Patientenalter, dem Staging und der mit dem T-Stadium erfassten Tumorgroße ermittelt werden

Für die weiterführende Untersuchung eines möglichen Einflusses der SST4-Expression auf das Überleben der Patienten wurde der für alle GEP-NEN ermittelte mediane IRS-Wert von 1,5 als Cut-Off zwischen einer niedrigen und einer hohen SST4-Expression gewählt. In den Kaplan-Meier-Überlebensanalysen zeigte sich jedoch kein Unterschied im Überleben zwischen den Patienten mit einem Tumor mit einem SST4-IRS-Wert unter 1,5 und denjenigen mit einer Neoplasie mit einem IRS-Wert größer oder gleich 1,5 (Log-Rank-Test: $p = 0,594$; Breslow-Test: $p = 0,073$; Abbildung 54).

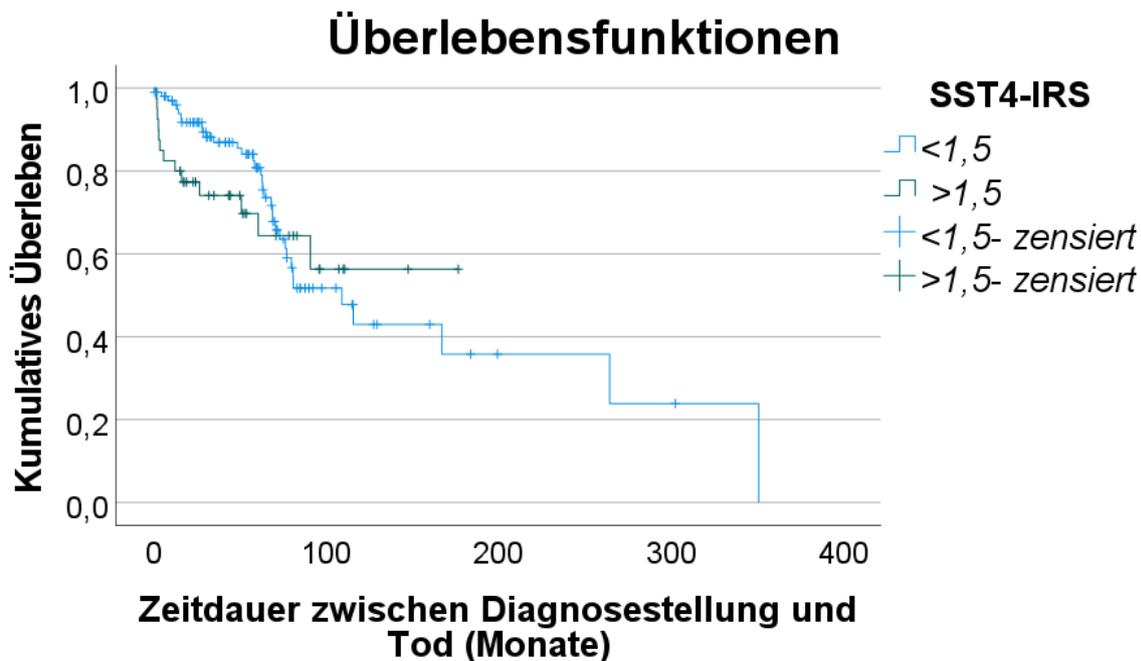


Abbildung 54: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des Einflusses der SST4-Expression auf das Überleben von Patienten mit einem GEP-NEN. Als Cut-off wurde der für alle GEP-NEN ermittelte mediane IRS-Wert von 1,5 gewählt.

5.3.3.2.2. Korrelationen zwischen der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression und Markern für neuroendokrine Tumore bei gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien

Die Analysen zu einem möglichen Zusammenhang zwischen der SST4-Expression in den GEP-NEN und verschiedenen Markern für neuroendokrine Tumore ergaben eine negative

Korrelation zwischen den SST4-IRS-Werten und der Serotonin-Konzentration im Blut sowie eine positive Korrelation zwischen der SST4-Expression und der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 oder des Immuncheckpoint-Proteins PDL-1. Ebenfalls ein signifikant positiver Zusammenhang zeigte sich in den GEP-NEN zwischen dem SST4-Vorkommen und der Anwesenheit der Rezeptoren Dopamin-D2, SST1, SST3 oder SST5 oder der Expression des Markers für neuroendokrine Tumore Chromogranin A (CgA).

Keine signifikante Korrelation konnte zwischen der SST4-Expression und der Präsenz des SST2 oder des Chemokinrezeptors CXCR4 festgestellt werden.

Die nachfolgende Tabelle 5 gibt einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten signifikanten Korrelationen zwischen der SST4-Expression und verschiedenen typischen Markern für neuroendokrine Tumore in GEP-NEN:

Tabelle 5: Signifikante Korrelationen zwischen der SST4-Expression und verschiedenen Markern für neuroendokrine Neoplasien in den ausgewerteten gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien.

		IRS SST4
Serotonin-Konzentration (Serum)	Korrelationskoeffizient:	-0,322
	Signifikanz:	0,023
Ki-67-Index	Korrelationskoeffizient:	0,257
	Signifikanz:	0,001
IRS Dopamin-D2- Rezeptor	Korrelationskoeffizient:	0,235
	Signifikanz:	0,004
IRS SST1	Korrelationskoeffizient:	0,223
	Signifikanz:	0,004
IRS SST3	Korrelationskoeffizient:	0,172
	Signifikanz:	0,026
IRS SST5	Korrelationskoeffizient:	0,189
	Signifikanz:	0,015

IRS PDL-1	Korrelationskoeffizient:	0,399
	Signifikanz:	0,000
IRS Chromogranin A (CgA)	Korrelationskoeffizient:	0,181
	Signifikanz:	0,019

5.3.3.2.3. Vergleich der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression zwischen den verschiedenen Primärtumorlokalisationen der gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien

Beim Vergleich der SST4-Expression zwischen den verschiedenen Primärtumorlokalisationen der GEP-NEN zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Tumoren aus dem Pankreas und dem Ileum (Mann-Whitney-U-Test: $p \leq 0,001$) bzw. der Appendix (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,029$).

Für die GEP-NEN des Rektums konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied zu den GEP-NEN des Ileums (Mann-Whitney-U-Test: $p \leq 0,001$), allerdings nicht zu den GEP-NEN der Appendix ermittelt werden.

Die SST4-Expression in den GEP-NEN des Magens, des Duodenums/Jejunums und des Kolons war im Vergleich zu der in den GEP-NEN des Pankreas und des Rektums ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich.

5.3.3.3. Korrelationsanalysen –bronchopulmonale neuroendokrine Neoplasien

5.3.3.3.1. Korrelationen zwischen der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression und den klinischen Daten bei bronchopulmonalen neuroendokrinen Neoplasien

Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der SST4-Expression und dem T-Stadium, dem Grading oder dem Staging in den BP-NEN ermittelt werden. Es ist hierbei jedoch anzumerken, dass aufgrund der Verwendung einer anderen, mehr klinisch bezogenen Stadieneinteilung durch die Pathologen in Bad Berka nur 2 BP-NENs für eine Staging-Auswertung zur Verfügung standen.

Auch das N- oder M-Stadium der Tumore hatte keinen Einfluss auf die SST4-Expression.

Bei den BP-NEN wurde für die Untersuchung des Einflusses der SST4-Expression auf das Überleben der Patienten der für alle BP-NEN ermittelte mediane IRS-Wert von 1,0 als Cut-Off zwischen einer hohen oder niedrigen SST4-Expression gewählt. Im Gegensatz zu den GEP-NEN zeigte die SST4-Expression in den BP-NEN eine positive Auswirkung auf das Überleben.

Dies war sowohl anhand der Kaplan-Meier-Kurven (Abbildung 55) als auch aus den Ergebnissen des Log-Rank- ($p = 0,021$) oder Breslow-Tests ($p = 0,007$) ersichtlich.

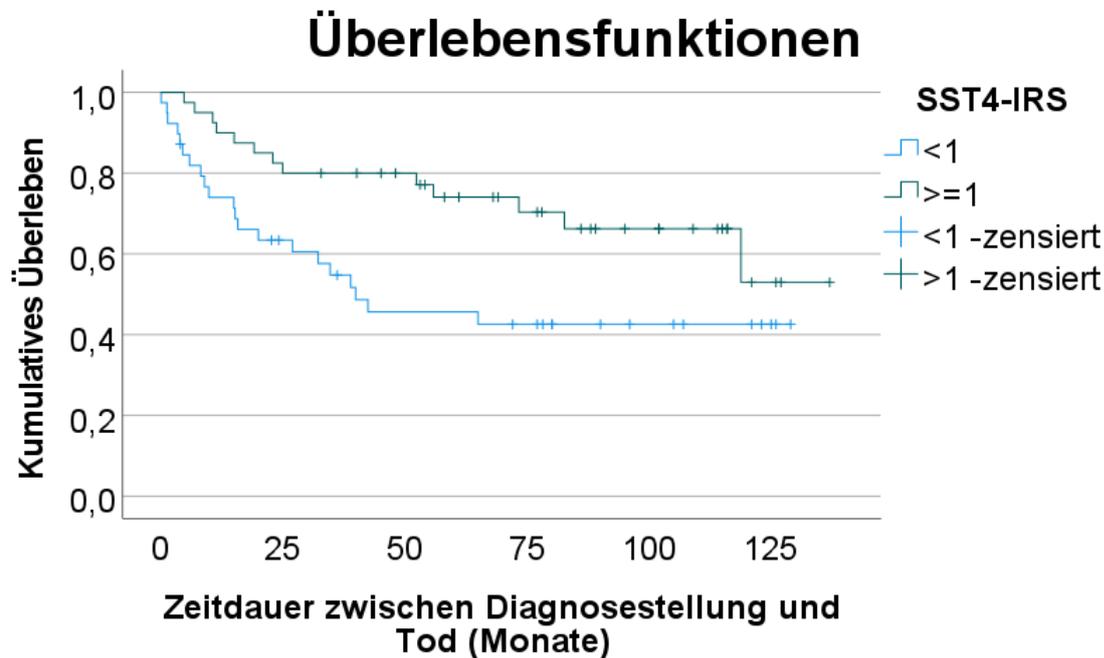


Abbildung 55: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung des Einflusses der SST4-Expression auf das Überleben von Patienten mit einem BP-NEN. Als Cut-off wurde der für alle BP-NEN ermittelte mediane IRS-Wert von 1,0 gewählt.

5.3.3.3.2. Korrelationen zwischen der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression und Markern für neuroendokrine Tumore bei bronchopulmonalen neuroendokrinen Neoplasien

Bei den BP-NEN konnte lediglich eine signifikante negative Korrelation zwischen der SST4-Expression und der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 ermittelt werden (Spearman-Rho-Test: $r = -0,213$, $p = 0,044$).

Keine signifikante Korrelation mit der SST4-Expression in den BP-NENs zeigten das Patientenalter und das Gesamtüberleben, die Expression des CgA, die Expression der vier anderen SST, des Dopamin-D2-Rezeptors, des CXCR4 und des PDL-1 sowie die Expression von Insulin, Glucagon und Somatostatin-14/28 in den Tumoren.

5.3.3.3. Vergleich der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression zwischen den verschiedenen Tumorentitäten der bronchopulmonalen neuroendokrinen Neoplasien

Zwischen den verschiedenen BP-NEN-Entitäten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der SST4-Expression.

6. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Überblick über das Vorkommen des SST4 in einer großen Anzahl an humanen Normal- und Tumorgeweben sowie in neuroendokrinen Tumoren zu gewinnen und die Ergebnisse für eine weitere Charakterisierung des hierbei eingesetzten neuen monoklonalen Antikörpers mit den verfügbaren Angaben aus der Literatur zu vergleichen.

6.1. Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Normalgeweben

In den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Cortex-Präparaten konnte eine zytoplasmatische SST4-Expression sowohl in den Somata als auch in den Dendriten und Neuriten der Pyramidenzellen verzeichnet werden, was die bisherigen Literaturangaben bestätigt (Selmer et al. 2000). Passend dazu zeigten sich insbesondere die Cortex-Schichten III (Lamina pyramidalis externa) und V (Lamina pyramidalis interna) in jenen Präparaten angefärbt, in welchen die Schichten des Cortex gut zu differenzieren waren. Da es sich bei den untersuchten Präparaten um chirurgisches Zugangsgewebe zu tiefergelegenen Tumoren handelte, waren einige Präparate durch den sich in der Nähe befindlichen Prozess möglicherweise bereits so pathologisch verändert, dass sie keine typische Cortex-Schichtung mehr zeigten.

Interessanterweise wurde der SST4 in den Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern vor allem in den Laminae III und IV nachgewiesen (Selmer et al. 2000), wohingegen die mRNA-Analysen von Schindler et al. (1995) eine SST4-Expression insbesondere in den Laminae III und V ergeben hatten und somit mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit besser übereinstimmen.

Dem SST4 wird eine noch weitestgehend unerforschte Rolle in den höheren Funktionsabläufen des menschlichen Gehirns zugesprochen (Selmer et al. 2000). Untersuchungen an Ratten-Cortices lassen unter anderem eine Funktion des SST4 bei der Zellregeneration im Cortex vermuten (Schreff et al. 2000). Weiterhin weisen Beobachtungen an SST4-Knock-out-Mäusen darauf hin, dass der SST4 einen wichtigen protektiven Einfluss auf den Verlauf epileptischer Anfälle aufzuweisen scheint und einen möglichen Angriffspunkt für zukünftige Antiepileptika darstellen könnte (Qiu et al. 2008).

Um ein aussagekräftigeres und detaillierteres Bild zum Vorkommen des SST4 in den einzelnen Regionen des humanen Cortex zu erlangen und damit auch die möglichen Funktionen des SST4 im menschlichen Gehirn besser abschätzen zu können, wäre eine genauere Untersuchung des menschlichen Cortex im Hinblick auf die Expression des SST4 nötig, als dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgrund der begrenzten Anzahl an

Präparaten und deren nur ungenauen Zuordnung zu spezifischen Cortex-Arealen realisierbar war.

Da vorangegangene Untersuchungen mittels mRNA-Analysen und polyklonalen Antikörpern bereits eine SST4-Expression im Cortex beschrieben hatten (Gunther et al. 2018, Selmer et al. 2000), konnte die Anfärbung der Pyramidenzellen mit dem neuen Antikörper 7H49L61 als eine erfolgreiche Positiv-Kontrolle gewertet werden.

Bei den vier Präparaten, welche vor der immunhistochemischen Färbung mit dem Peptid 2 inkubiert worden waren, präsentierte sich ein ähnliches Färbeergebnis wie ohne Peptid-Inkubation, während die Inkubation mit dem Peptid 1, welches zur Immunisierung des Kaninchens verwendet worden war, eine vollständige Auslöschung des Immunsignals bewirkte. Dies konnte als ein erfolgreicher Nachweis der Spezifität des neuen Antikörpers 7H49L61 angesehen werden.

Ein Vorkommen des SST4 in Hinterwurzel- und Trigeminalganglienzellen ist bereits mehrfach in der Literatur bei Ratten beschrieben worden (Bar et al. 2004, Gunther et al. 2018). Mittels mRNA-Analyse konnte der SST4 außerdem in den Neuronen von Maus-**Trigeminalganglien** nachgewiesen werden (Kecskes et al. 2020).

Die im Rahmen dieser Arbeit an den humanen Trigeminalganglien-Präparaten erzielten Ergebnisse stimmen mit den bisherigen Literaturangaben über ein somatodendritisches Vorliegen des SST4 in den Trigeminalganglien von Ratten überein (Gunther et al. 2018). Wir konnten den SST4 sowohl in den Dendriten als auch, mit einer ebenso deutlichen Expression, in den Perikaryen der Trigeminalganglienzellen auffinden. Ebenfalls wiesen einige der umgebenden Mantelzellen den SST4 in unterschiedlicher, im Vergleich zu den Neuronen aber mit geringerer Expressionsstärke auf.

In den ausgewerteten Präparaten der **Hypophyse** fand sich eine deutliche Anfärbung der Neurohypophyse, wohingegen nur in wenigen Zellen der Adenohypophyse eine schwache zytosolische Expression des SST4 verzeichnet werden konnte. Dies passt zu bisherigen Literaturangaben: Diese messen dem SST4 eine nur untergeordnete Rolle in den neuroendokrinen Vorgängen der Adenohypophyse bei und beschreiben mehrfach das Vorkommen des SST4 in verschiedenen Regionen des Zentralen Nervensystems, zu welchem die Neurohypophyse im Gegensatz zur Adenohypophyse entwicklungsgeschichtlich gehört (Panetta und Patel 1995, Reubi et al. 2001, Gunther et al. 2018).

Einige mRNA-Analysen sowie immunhistochemische Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern konnten hingegen keinen Hinweis auf ein Vorkommen des SST4 im adulten Hypophysen-Vorderlappen finden. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, ebenso auch zu anderen Literaturangaben. Zum einen wurde in der

vorliegenden Arbeit in allen 3 untersuchten Präparaten zumindest eine geringe SST4-Expression im hormonproduzierenden Vorderlappen der Hypophyse beobachtet. Zum anderen sprechen Untersuchungen an Hypophysentumoren und an Hypophysenadenom-Zellkulturen ebenfalls für eine SST4-Expression im Hypophysenvorderlappen: So konnte der SST4 mittels mRNA-Analysen in 40% der Hypophysentumore gefunden werden (Panetta und Patel 1995, Taniyama et al. 2005). Weiterhin konnte durch die Behandlung von aus Hypophysenadenomen gewonnenen Zellkulturen mit dem Präparat Somatoprim, welches neben dem SST2 und dem SST5 auch den SST4 ansteuert, eine Unterdrückung der überschießenden Hormonproduktion in mehr Zellkulturen erreicht werden als mit einem Präparat ohne den zusätzlichen SST4-Angriffspunkt (Plockinger et al. 2012). Dies lässt darauf schließen, dass der SST4 in Hypophysenvorderlappen-Zellen vorkommt, welche entarten und sich zu einem Adenom entwickeln können.

Die Möglichkeit, dass ausschließlich die bereits entarteten Adenomzellen und nicht die normalen Hypophysenvorderlappen-Zellen den SST4 exprimieren, erscheint aufgrund der proliferationshemmenden Wirkung von Somatostatin zwar eher unwahrscheinlich, gleichzeitig beobachtet man jedoch gerade eine solche SST-Überexpression in anderen Tumoren wie GEP-NEN und hat auf dieser Tatsache aufbauend verschiedene Diagnostik- und Therapiemodalitäten für diese Tumore entwickelt.

Man könnte aber auch argumentieren, dass aufgrund des bekannten, innerhalb der SSTs exklusiven wachstumsfördernden Signalwegs des SST4 über die PKC und den STAT3 eine erstmalige Expression in Adenomzellen entstehen könnte. Dagegen sprechen jedoch wiederum die Ergebnisse von Plockinger et al., welche in ihren Untersuchungen eine eindeutige Hemmung der Hormonausschüttung beobachten konnten (Plockinger et al. 2012, Theodoropoulou und Stalla 2013, Gunther et al. 2018).

Weitere Untersuchungen an gesunden Adenohypophysen und Hypophysenadenomen könnten zukünftig zusätzliche Hinweise auf die Rolle des SST4 bei der Regulation der Hormonausschüttung, insbesondere in Hinblick auf eine Behandlung der überschießenden Hormonausschüttung bei den unterschiedlichen Hypophysentumor-Entitäten, geben.

Bereits 1997 war das Vorkommen des SST4 in der menschlichen **Plazenta** systematisch überprüft und beschrieben worden (Caron et al. 1997). Das mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper 7H49L61 erzielte Immunsignal konnte deshalb als eine erfolgreiche Positivkontrolle gewertet werden.

Die Auswertung der Placenta-Präparate im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab eine zytosolische sowie eine teilweise membranständig auftretende SST4-Expression in den Trophoblast- und Deziduaellen der Plazenta und konnte somit vorangegangene Untersuchungen ergänzen.

Bei den Plazenta-Präparaten, welche vor der immunhistochemischen Färbung mit dem Peptid 2 inkubiert worden waren, zeigte sich eine Färbung wie ohne Peptidinkubation, Die Inkubation der Präparate mit dem Peptid 1 bewirkte dagegen eine komplette Neutralisation des Immunsignals. Auch hier wurde dies als eine erfolgreiche Spezifitätskontrolle für den zu charakterisierenden Antikörper 7H49L61 gewertet.

In den zwei untersuchten Präparaten des menschlichen **Herzens** fand sich keinerlei immunhistochemische Anfärbung in den Herzmuskelzellen. Dieses Ergebnis bestätigt vorangegangene Untersuchungen mittels mRNA-Analysen an menschlichen Herzmuskelzellen (Smith et al. 2005). Interessanterweise hatten Smith et al. in den humanen Myozyten eine Expression ausschließlich des SST1 und des SST2, im Gegensatz dazu aber in den Fibroblasten des menschlichen Herzens ein Vorkommen des SST1, SST2, SST4 und des SST5 beschrieben. Eine detailliertere Untersuchung, in welchen Zellen des Herzens der SST4 mit welcher Expressionsrate vorkommt, könnte insbesondere im Hinblick auf die Fibroblasten-Proliferation und ihre Hemmung durch Somatostatin oder dessen Analoga bedeutsam werden, z.B. im Rahmen der Narbenbildung nach Ischämie.

RT-PCR-Untersuchungen hatten in den **Lymphknoten** von Mäusen und Ratten ein Vorkommen der SST4-mRNA nachweisen können. Auch in immunhistochemischen Analysen mit polyklonalen Antikörpern konnte der SST4 in 18% der Präparate einer größeren Serie humaner MALT-Lymphome aufgefunden werden (Lichtenauer-Kaligis et al. 2000, Stollberg et al. 2017).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten fünf Präparate von **Lymphknoten** wiesen hingegen keinerlei Immunsignal auf.

Somit könnte man zum einen vermuten, dass es speziesabhängige Unterschiede in der SST4-Expression im Lymphgewebe geben könnte. Zum anderen wäre denkbar, dass es erst im Rahmen einer Tumorerkrankung des Lymphgewebes zu einer deutlichen SST4-Expression kommt. Diese These würde durch die in der vorliegenden Arbeit an humanen Lymphomen erhobenen Befunde weiter gestützt, welche eine mäßige bis starke SST4-Positivität in einem Großteil der untersuchten Tumoren zeigten (siehe Kapitel 5.1.2.26.).

Bei Untersuchungen mit Radioliganden an Rattengewebe war der SST4 als einzig vorkommender SST in der **Lunge** beschrieben worden (Fehlmann et al. 2000). Weitere Studien konnten eine Expression des SST2 und des SST5 ausschließlich in Alveolar-Makrophagen feststellen, welche jedoch dem mononukleär-phagozytierenden Teil des Immunsystems angehören und in der Lunge nur ortsansässig sind (Unger et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine sehr deutliche SST4-Expression in den Zellen des Respirationsepithels der **Bronchien**, wobei die Flimmerhärchen sich interessanterweise komplett SST4-negativ präsentierten. Unterhalb der Basalmembran war ebenfalls keine Anfärbung zu verzeichnen. Auch das restliche **Lungengewebe** stellte sich als SST4-negativ dar.

Die Ergebnisse unserer Auswertung unterstützen und konkretisieren die Literaturangaben von Fehlmann et al., da diese keine genaue Lokalisation der Expression des SST4 in der Lunge angeben. Der SST4 scheint als einziger SST und ausschließlich in den Zellen des respiratorischen Epithels in der humanen Lunge vorzukommen. Zukünftige Untersuchungen könnten einen genaueren Aufschluss über seine Funktion und Bedeutung in und für die Bronchien geben.

Im Rahmen unserer Analysen fanden wir in den Gewebspräparaten der menschlichen **Schilddrüse** keinen Hinweis auf ein Vorkommen des SST4. Dies stimmt mit den Ergebnissen von mRNA-Analysen in der Literatur überein, welche den SST4 als den einzigen nicht-exprimierten SST-Subtypen in der humanen Schilddrüse beschreiben (Klagge et al. 2010).

Die Untersuchung des gesunden **Nebenschilddrüsengewebes** auf ein Vorkommen des SST4 wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus Mangel an gesunden menschlichen Gewebeschnitten an nur einem Präparat vorgenommen, in welchem gesundes neben neoplastisch verändertem Nebenschilddrüsen-Gewebe vorlag. In diesem Präparat wurde eine mäßige, jedoch nahezu in allen Zellen auftretende Immunreaktion aufgefunden. Diese Beobachtung deckt sich mit früheren, mit Hilfe von polyklonalen Kaninchen-Antikörpern erzielten immunhistochemischen Ergebnissen: Hier wurde der SST4 in 3/3 Präparaten von gesundem menschlichen Nebenschilddrüsengewebe gefunden, während die anderen SST-Subtypen in einer geringeren Anzahl an Präparaten oder als nicht-exprimiert beschrieben wurden. Hinzuzufügen ist, dass laut dieser Studie der SST4 scheinbar nur in den Hauptzellen, hingegen nicht in den oxyphilen Zellen der Nebenschilddrüse exprimiert wird (Taniyama et al. 2005).

Im Kontrast zu unseren sowie zu den Beobachtungen von Taniyama et al. stehen die Ergebnisse einer immunhistochemischen Studie, die mit Hilfe eines anderen monoklonalen Anti-SST4-Antikörpers erhoben wurden. Hier konnte keine Expression des SST4 in der gesunden menschlichen Nebenschilddrüse nachgewiesen werden (Storvall et al. 2019).

Es gibt in der Literatur keinen Hinweis auf ein Vorkommen des SST4 im **Lebergewebe**. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten Präparate der menschlichen Leber zeigten eine nur vereinzelt vorkommende und dann nur schwach ausgeprägte Anfärbung der

Hepatozyten, sodass von keiner bedeutsamen Expression des SST4 in diesem Gewebe auszugehen ist.

Bei der Ratte und der Maus konnte mittels RT-PCR eine SST4-Expression im **Milzgewebe** nachgewiesen werden, nicht jedoch in ausgewählten menschlichen B- und T-Zell-Linien (Lichtenauer-Kaligis et al. 2000). Bisherige Untersuchungen an humanem Milzgewebe hinsichtlich einer SST-Expression konnten zwar eine deutliche Expression des SST2A nachweisen, ein Vorkommen des SST4 in der menschlichen Milz ist bislang aber weder direkt untersucht, noch zufällig entdeckt oder beschrieben worden (Ferone et al. 2012). In dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Präparat fand sich keine Anfärbung und somit kein Hinweis auf eine SST4-Expression. Nach jetzigem Erkenntnisstand erscheint ein regelhaftes Vorkommen des SST4 in der menschlichen Milz somit eher unwahrscheinlich.

Den immunhistochemischen Analysen mit polyklonalen Antikörpern, in welchen eine hohe Expressionsrate des SST1, des SST3 und des SST4 in den endokrinen Zellen des humanen **Pankreasgewebe** beschrieben wurde, ist in der Literatur mittlerweile vielfach widersprochen worden: Während eine Expression des SST2 und des SST5 in den Inselzellen des Pankreas und ein Einfluss dieser Rezeptoren auf die Insulin- und Glukagon-Ausschüttung mehrfach nachgewiesen werden konnten, fanden mRNA-Analysen an adultem Ratten-Pankreas keinerlei Hinweis auf ein Vorkommen des SST4 (Portela-Gomes et al. 2000). Ebenso konnten immunhistochemische Untersuchungen mit polyklonalen Kaninchen-Antikörpern den SST4 weder im exokrinen noch im endokrinen Pankreas des Menschen nachweisen (Unger et al. 2012, Ludvigsen et al. 2015).

Die Analysen an den menschlichen Pankreaspräparaten, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgenommen wurden, bestätigen die SST4-Negativität des endokrinen menschlichen Pankreas. Ein zytoplasmatisches und membranständiges Immunsignal konnte jedoch in den Azinuszellen des exokrinen Pankreas beobachtet werden. Zudem wurde ein deutlich membranständiges Immunsignal an den Ausführungsgängen des Pankreas verzeichnet, welches jedoch innerhalb der untersuchten Präparate in der Intensität stark variierte. Es wäre denkbar, dass der SST4 an den Ausführungsgängen einen regulierenden Effekt besitzt, welcher der exokrinen Funktion des Pankreas nachgeschaltet ist.

Weitere Untersuchungen zur SST4-Expression im gesunden Pankreasgewebe des Menschen wären sehr wünschenswert, um das Vorkommen und die Bedeutung des SST4 in diesem Organ, auch im Hinblick auf Dysfunktionen und Erkrankungen besser verstehen und einordnen zu können.

In den drei mit dem neuen monoklonalen Antikörper 7H49L61 immunhistochemisch angefärbten Präparaten der menschlichen **Niere** konnte eine zytosolische SST4-Expression in den distalen Tubuli sowie, etwas geringer ausgeprägt, in den proximalen Tubuli beobachtet werden. Ebenso zeigte sich ein Vorkommen des SST4 in den Glomeruli. Als SST4-negativ präsentierten sich die Zellen der Bowman-Kapsel und der Sammelrohre.

Zu übereinstimmenden Ergebnissen waren Untersuchungen mittels RT-PCR-Analyse, immunhistochemischer Färbung mit polyklonalen Antikörpern und Immunfluoreszenz gekommen: Diese hatten ein vorwiegend zytoplasmatisches Vorkommen aller SST-Subtypen in den proximalen und distalen Tubuli der menschlichen Niere sowie in den Zellen der Henle-Schleifen gefunden. Auch die Mesangiumzellen und die Podozyten der Glomeruli hatten sich in diesen Untersuchungen positiv für den SST1, den SST2B, den SST4 und den SST5 gezeigt, wobei die Autoren der Publikation nicht detailliert darauf eingingen, welcher Subtyp in welcher der Glomerulus-Zellen mehr oder weniger exprimiert vorlag (Bhandari et al. 2008). Somit widersprechen diese Ergebnisse unseren Beobachtungen einer SST4-negativen Bowman'schen Kapsel nicht.

Interessanterweise hatten Bhandari et al. im Rahmen ihrer Arbeit eine sehr geringe Expression des SST4 in den Glomeruli gesunder Nieren, jedoch ein deutlich vermehrtes SST4-Vorkommen in den Glomeruli von Patienten, die an einer IgA-Nephropathie erkrankt waren, beobachten können. Zwar traf diese vermehrte Präsenz in den erkrankten Glomeruli für alle SST-Subtypen zu, doch war die Steigerung der Expression für den SST4 im Verhältnis zum gesunden Gewebe mit Abstand am deutlichsten. Es bleibt abzuwarten, ob sich aus dieser Erkenntnis und mit Hilfe weiterer Untersuchungen eine Bedeutung für die SST und insbesondere für den SST4 in der Behandlung von IgA-Nephropathien und anderen Glomerulopathien ergeben könnte.

Ein Vorkommen des SST4 war neben einer Expression der anderen SST-Subtypen bereits Anfang der 2000er Jahre sowohl für die **Nebenniere** der Ratte als auch wenig später für die Nebenniere des Menschen beschrieben worden. Die Beobachtungen stützten sich dabei auf RT-PCR-Analysen, Southern Blots sowie auf die Technik der In-situ-Hybridisierung (O'Carroll 2003, Ueberberg et al. 2005).

In den immunhistochemischen Auswertungen der vorliegenden Arbeit war es möglich, die SST4-Expression in der menschlichen Nebennierenrinde noch detaillierter zu beschreiben: Während sich das Immunsignal in der Zona glomerulosa als äußerste Schicht der Nebennierenrinde als eher mäßig und zytoplasmatisch und membranständig vorliegend darstellte, konnte in der mittleren Zona fasciculata eine deutliche membranständige Anfärbung und in der inneren Zona reticularis eine eindeutige zytosolische Anfärbung verzeichnet werden.

Das teilweise in den Präparaten mitangeschnittene Nebennierenmark präsentierte sich dagegen als SST4-negativ.

Aus der Literatur war durch immunhistochemische Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern bereits bekannt, dass alle SST-Subtypen im **Magen- und Duodenalgewebe** exprimiert vorliegen (Taniyama et al. 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten das Vorkommen des SST4 in den **Magendrüsen** bestätigen. Die SST4-Expression wurde dabei als membranständig und zytoplasmatisch beobachtet. Hingegen konnte in dem zwischen den Drüsenzellen liegenden Bindegewebe, in der Tela submucosa sowie in allen darunter liegenden Gewebeschichten des Magens kein SST4-Vorkommen verzeichnet werden. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die SST4-Expression im Magen auf die Drüsenzellen beschränkt ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte auch das Vorkommen des SST4 in den submukösen Brunnerdrüsen des **Duodenums** bestätigt werden, wobei die Rezeptorexpression als vorwiegend membranständig bewertet wurde. Ebenfalls membranständig angefärbt zeigten sich die duodenalen Mikrovilli, das einschichtige Zylinderepithel in den Duodenalkrypten und auf den Duodenalzotten sowie die in den Krypten vorhandenen Panethzellen.

In den in der Literatur beschriebenen immunhistochemischen Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern konnte der SST4 als einziger SST-Subtyp in keinem der drei der dort untersuchten Präparate des **Colons** in den epithelialen Zellen nachgewiesen werden (Taniyama et al. 2005). Dem gegenüber stehen die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, welche an zwei Präparaten des Colon transversum vorgenommen worden waren: Bei der immunhistochemischen Färbung mit dem neuen Antikörper 7H49L61 konnte eine deutliche, vorwiegend membranständige Anfärbung sowohl apikal in den Epithelzellen als auch an ihren Zell-Zell-Kontaktstellen verzeichnet werden.

Weiterführende Studien, welche eine möglichst große Anzahl an Präparaten von verschiedenen Anteilen des menschlichen Colons (Colon ascendens, transversum, descendens und sigmoideum) umfassen sollten, wären sehr wünschenswert, um detailliertere und aussagekräftigere Ergebnisse über das Vorkommen und Verhalten des SST4 im Dickdarm zu erhalten.

In der Literatur lassen sich bisher keine Daten über eine mögliche SST4-Expression im **Knochengewebe**, im **Fettgewebe** oder in den **Blutgefäßen** finden. Die einzige Ausnahme hiervon stellen die Untersuchungsergebnisse von immunhistochemischen Färbungen mit polyklonalen Antikörpern an menschlichem Knochenmark dar, in welchen dieses als negativ hinsichtlich einer SST-Subtyp-Expression bewertet worden war (Unger et al. 2012).

In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch analysierten Knochenstanzen stellten sich alle enthaltenen Zellen, inklusive der Knochenmarkszellen, als SST4-negativ dar. Ohne eine Anfärbung präsentierten sich ebenfalls die menschlichen Fettzellen sowie die angeschnittenen Blutgefäße, welche in einigen Präparaten gesunder menschlicher Gewebe sowie in Präparaten von menschlichen Tumoren mit angeschnitten waren. Ein Vorkommen des SST4 in diesen Geweben erscheint deshalb, nach jetzigem Kenntnisstand, sehr unwahrscheinlich.

Im Gewebe der weiblichen **Mamma** konnte in der vorliegenden Arbeit eine deutliche SST4-Positivität in den Epithelzellen der angeschnittenen Ductus verzeichnet werden. Da sich diese Beobachtung auf ein einziges Präparat stützt, in welchem das gesunde Gewebe neben einem Tumor vorlag, ist die Aussagekraft dieses Befundes allerdings nur als gering zu bewerten. Die zum Vergleich herangezogenen immunhistochemischen Färbungen mittels polyklonaler Antikörper aus der Literatur hatten keinen Hinweis auf ein Vorkommen des SST4 oder eines der anderen SST-Subtypen im gesunden menschlichen Brustgewebe ergeben (Unger et al. 2012). Allerdings war die Spezifität der dabei verwendeten polyklonalen Antikörper, insbesondere des Anti-SST4-Antikörpers, im Diskussionsteil der Arbeit von den Autoren selbst in Frage gestellt worden: mehrere ihrer Untersuchungsergebnisse, wie z.B. eine SST4-Negativität der Schilddrüse und der Plazenta, hatten in starkem Widerspruch zu anderen Arbeiten gestanden (Caron et al. 1997, Taniyama et al. 2005, Unger et al. 2012). Weitere Analysen zu einem SST4-Vorkommen in der menschlichen Mamma wären sinnvoll, um eine detailliertere Einschätzung über das Vorkommen des SST4 sowie seine Rolle im gesunden Mamma-Gewebe vornehmen zu können.

Auch die immunhistochemischen Analysen, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit am gesunden menschlichen **Ovar** vorgenommen wurden, beschränkten sich auf zwei Präparate, in welchen das gesunde Gewebe neben dem Ovarialkarzinom vorlag. In diesen Präparaten konnte eine kräftig ausgeprägte zytosolische SST4-Expression in einigen Zellen der Theka-interna verzeichnet werden. Außerdem zeigten sich einige Zellen im peritoneal-ovariellen Übergang sowie in den äußeren Begrenzungen einiger Primordialfollikel SST4-positiv. Zum Vergleich unserer Ergebnisse am gesunden menschlichen Ovar lagen, ebenso wie bei der Mamma, ausschließlich die Befunde von immunhistochemischen Untersuchungen mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern vor (Unger et al. 2012). Diese hatten ebenfalls eine Expression aller SST-Subtypen, inklusive des SST4, im humanen Ovarialgewebe feststellen können.

Über ein Vorkommen des SST4 in der menschlichen **Tuba uterina** oder in der gesunden **Zervix** ist in der Literatur keine Angabe zu finden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Untersuchung beider gesunder Gewebe an jeweils einem Tumorpräparat vorgenommen, in welchem sie parallel zu den neoplastisch veränderten Zellen aufzufinden waren. Die beschriebenen Beobachtungen sind aus diesem Grunde weder als aussagekräftig noch als vollkommen anzusehen, sondern sollen lediglich eine erste Beschreibung der SST4-Expression in diesen Geweben darstellen.

In den Epithelzellen der **Tuba uterina** konnte eine intensive zytosolische und membranständige Expression des SST4 verzeichnet werden. In der **Zervix** zeigten die epithelialen Drüsenzellen eine geringe bis mäßige, als rein zytosolisch gewertete SST4-Expression. Andere Zellarten präsentierten sich in beiden Geweben durchgängig als SST4-negativ.

Immunhistochemische Untersuchungen mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern an der gesunden menschlichen **Prostata** hatten in der Vergangenheit unterschiedliche Ergebnisse erbracht: In einer Analyse war in über 85% der Prostata-Zellen eine zarte zytoplasmatische Anfärbung und somit zumindest ein geringes Vorkommen des SST4 in den meisten menschlichen Prostata-Zellen beobachtet worden. Ebenso hatten sich auch die anderen SST-Subtypen in der Prostata exprimiert gezeigt, jedoch größtenteils, wie der SST4, in einer eher geringen Expressionsstärke (Montironi et al. 2008).

In anderen Untersuchungen konnte dagegen keine Anfärbung und somit keine Expression der fünf SST-Subtypen in der Prostata verzeichnet werden (Unger et al. 2012).

Die immunhistochemische Analyse der gesunden menschlichen Prostata im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte an nur einem Präparat vorgenommen werden, in welchem das gesunde Gewebe neben dem neoplastisch veränderten vorlag. Die Aussagekraft ist demzufolge aufgrund der niedrigen Gewebeprobeanzahl und dessen Nähe zu neoplastischem Gewebe als nur sehr eingeschränkt zu bewerten. Bei der immunhistochemischen Färbung mit dem neuen monoklonalen Antikörper 7H49L61 konnte jedoch, ebenso wie bei Unger et al. (2012), keine SST4-Expression beobachtet werden.

Auch im menschlichen **Hoden** war bei den Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern keine Expression des SST4 verzeichnet worden (Unger et al. 2012). Hingegen zeigten die beiden Präparate, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch analysiert worden waren, reichlich angefärbte Zellen der Tubuli seminiferi, wobei sich jedoch eine hohe Variabilität in den Immunsignalen beobachten ließ, die von einer intensiven bis zu keiner nachweisbaren SST4-Expression reichte. Die Untersuchung des gesunden menschlichen Hodengewebes erfolgte anhand zweier Tumorpräparate, in denen unverändertes Gewebe

neben neoplastischem angeschnitten war. Weitere Untersuchungen an einer größeren Anzahl an gesundem Hodengewebe wären hinsichtlich einer besseren Aussagekraft auch hier sehr wünschenswert.

6.2. Immunhistochemische Untersuchungen an menschlichen Tumoren

Das Vorkommen des SST4 im menschlichen Gehirn wurde durch zahlreiche Studien bestätigt und ist allgemeiner Konsens (Gunther et al. 2018).

Ebenfalls mehrfach untersucht wurde das Auftreten der SST-Subtypen SST2, SST3 und SST5 in verschiedenen Gehirntumoren, wobei sich eine nur geringe Expression der untersuchten SST in den neoplastischen Zellen selbst zeigte, jedoch ein deutliches Auftreten in den Kapillaren der Tumore beobachtet werden konnte (Cervera et al. 2002, Lange et al. 2018). Der therapeutische Einsatz von Radionuklid-gekoppeltem Octreotid bei Patienten mit einem Glioblastom konnte vereinzelt überraschend gute Ergebnisse in Bezug auf die Überlebenszeit und die Lebensqualität erbringen und wird derzeit als potenzielle therapeutische Option im Individualfall diskutiert (Heute et al. 2010, Kiviniemi et al. 2017). In Bezug auf den SST4 konnte in einer 1998 veröffentlichten Studie mittels RT-PCR in fünf der sieben untersuchten Glioblastome (WHO-Grad III-IV) eine SST4-mRNA-Expression nachgewiesen werden. Insgesamt wurden in dieser Studie 58% der untersuchten Meningeome und Glioblastome als SST4-positiv gewertet. Die Autoren konnten dabei allerdings keinen Hinweis auf eine Korrelation zwischen dem Auftreten der unterschiedlichen SST-Subtypen und den verschiedenen Glioblastom-Tumortypen, ihrer Tumor-Histologie oder bestimmten Lokalisationen der Tumore finden (Dutour et al. 1998).

In den mit Hilfe des neuen monoklonalen Antikörpers 7H49L61 erzielten immunhistochemischen Färbungen der vorliegenden Arbeit konnte eine niedrige bis mäßig-hohe SST4-Positivität in allen neun untersuchten Präparaten humaner **Glioblastome** verzeichnet werden. Der mittlere IRS lag bei 6,78 und war damit vergleichsweise hoch. Es konnte allerdings in den Schnitten beobachtet werden, dass die SST4-Expression insbesondere an den Rändern der Gliome auftrat und zum Tumorrinneren hin abnahm und letztlich ganz verschwand.

Zusammenfassend unterstützen unsere Ergebnisse die bisherige in der Literatur vertretene These, dass ein Vorkommen des SST4 in menschlichen Glioblastomen häufig zu sein scheint. Weiterführende Studien für eine detailliertere Aufklärung des SST4-Vorkommens in Glioblastomen und seiner möglichen Bedeutung für die Entwicklung und das Fortschreiten dieser Tumorerkrankung wären unserer Meinung nach als äußerst sinnvoll und wünschenswert anzusehen; insbesondere, da die Prognose dieser Erkrankung nach wie vor als sehr schlecht und die Behandlungsmöglichkeiten als limitiert einzustufen sind (Weller et al. 2015).

Die Expression des SST2 und des SST5 in **Hypophysenadenomen** ist weithin bekannt und stellt die molekulare Grundlage für die Behandlung dieser Erkrankungen mit Somatostatin-Analoga (SSA), wie beispielsweise der Akromegalie mit Octreotid oder des Morbus Cushing mit Pasireotid, dar (Cuevas-Ramos und Fleseriu 2014).

Interessanterweise konnte bei immunhistochemischen Untersuchungen mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern an 18 nicht-hormonproduzierenden Hypophysenadenomen nicht nur die Expression von mindestens drei der fünf Somatostatin-Rezeptoren in allen untersuchten Tumorgeweben, sondern auch eine SST4-Positivität in vier der fünf untersuchten chromophoben Adenome verzeichnet werden. Von den restlichen 13 als gonadotroph identifizierten Adenomen wiesen dagegen nur zwei Exemplare eine SST4-Positivität auf (Pawlikowski et al. 2003).

Weitere interessante Befunde bezüglich der SST4-Expression in Hypophysenadenomen konnten in einer an Hypophysenadenom-Zellkulturen vorgenommene Studie erhoben werden, in welcher die Wirksamkeit des SSA Octreotid, welches insbesondere den SST2 und den SST5 bindet, mit dem neuen SSA Somatoprim (DG3173), welches eine zusätzliche Bindungsaffinität für den SST4 besitzt, verglichen wurde. Hierbei zeigte sich, dass Somatoprim nicht nur eine gleichwertige Wirkung wie Octreotid besitzt, sondern darüber hinaus sogar bei einer größeren Anzahl an Adenomen und unter anderem auch bei sogenannten Octreotid-Non-Respondern erfolgreich eingesetzt werden kann (Plockinger et al. 2012). Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass der Unterschied zwischen den beiden Somatostatin-Analoga lediglich in der Bindungsaffinität für den SST4 liegt, ist deshalb davon auszugehen, dass zumindest eine gewisse Anzahl an Hypophysenadenomen den SST4 in bedeutender Menge exprimiert.

Auch die immunhistochemischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, welche an den zwei verfügbaren Präparaten humaner Hypophysenadenome vorgenommen wurden, würden die These einer bedeutenden SST4-Expression in einer gewissen Anzahl von Adenomen unterstützen: Während sich eines der Präparate komplett SST4-negativ darstellte, konnte in dem anderen Adenom eine starke Anfärbung verzeichnet werden.

Da mehrere unabhängige Studien mit unterschiedlichen Untersuchungsansätzen darauf hinweisen, dass eine SST4-Expression in bedeutendem Umfang in einer gewissen Kohorte der Hypophysenadenome aufzutreten scheint und sich der SST4 in pharmakologischen Untersuchungen mit entsprechenden SSA bereits als ein vielversprechendes Co-Target dargestellt hat, wäre eine weitere Erforschung des SST4-Vorkommens in dieser Tumorentität sehr wünschenswert. Insbesondere mit Hilfe von größeren Probenanzahlen könnte die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen der SST4-Expression und dem histologischen Typ der Hypophysenadenome detaillierter und aussagekräftiger beantwortet

werden. Unter Umständen würde dies den Weg für einen neuen pharmakologischen Angriffspunkt bei einem Teil dieser Tumore ebnen.

Unter der Bezeichnung Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) werden die **Adenokarzinome** und die **Plattenepithelkarzinome der Lunge** zusammengefasst.

Bei in der Literatur beschriebenen immunhistochemischen Untersuchungen an Adenokarzinomen konnte der SST5 mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern als der am stärksten exprimierte SST-Subtyp in über 77% der Tumore nachgewiesen werden. Eine SST4-Expression hingegen, welche mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern untersucht worden war, konnte nur in 4,5% der 22 untersuchten Adenokarzinome verzeichnet werden (Stumpf et al. 2018).

In der vorliegenden Arbeit fand sich in den 12 ausgewerteten **Adenokarzinomen** eine sehr heterogene SST4-Expression. Immerhin fünf der zwölf Präparate und somit 42% der untersuchten Adenokarzinome wiesen eine intensive immunhistochemische Anfärbung auf. Weitere vier Präparate zeigten eine geringe bis mäßige SST4-Expression. Drei und somit 25% der Adenokarzinom-Präparate wurden als SST4-negativ eingestuft. Insgesamt lag der durchschnittliche IRS für diese Tumorentität mit 4,5 oberhalb des gewählten Cut-offs für eine Positivität. Diese in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu Stumpf et al. gefundene deutlich höhere SST4-Expressionsrate könnte auf einer höheren Spezifität des neuen monoklonalen Antikörpers gegenüber dem von Stumpf et al. verwendeten polyklonalen Antikörper beruhen. Möglicherweise hat auch der histologische Typ der Adenokarzinome einen Einfluss auf das Ausmaß der SST4-Expression, was gleichzeitig die von uns beobachtete starke Heterogenität der Anfärbung gut erklären würde. Diese Hypothese müsste jedoch in weiterführenden Studien mit einer möglichst großen Anzahl an histologisch gut charakterisierten Proben genauer untersucht werden.

Im Vergleich zu den Adenokarzinomen zeigten alle zehn im Rahmen dieser Arbeit untersuchten **Plattenepithelkarzinome** der Lunge keinen Hinweis auf ein signifikantes Vorkommen des SST4, der mittlere IRS-Wert lag bei nur 0,68. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Analysen mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern in der Literatur, bei welchen in nur 4,8% der 21 untersuchten Plattenepithelkarzinome eine SST4-Expression verzeichnet werden konnte und der gemittelte IRS bei 1,0 lag (Stumpf et al. 2018).

Das **kleinzellige Bronchialkarzinom** (SCLC) zeichnet sich durch seine bei mikroskopischer Betrachtung namensgebend kleinen Zellen sowie einen hohen Mitose-Index aus (Ramirez et al. 2017). Das SCLC wird zu den neuroendokrinen Tumoren gezählt und macht einen Anteil von 15-25% der Lungentumore aus. Es hat eine besonders schlechte Prognose. Die mittlere

Überlebenszeit liegt unbehandelt bei 3 Monaten, bei therapeutischer Intervention bei lokal begrenzter Erkrankung bei 14-20 Monaten und bei Fernmetastasierung bei 8-12 Monaten (S3-Leitlinie Lungenkarzinom, Februar 2018).

In einer immunhistochemischen Untersuchung an Mikroarrays konnte der SST4 in keiner der 58 untersuchten SCLC-Proben aufgefunden werden, wohingegen die anderen SST-Subtypen in prozentual unterschiedlich vielen Proben, von 3,4% bis 69% reichend, nachgewiesen werden konnten (Tsuta et al. 2012). Bei einer anderen immunhistochemischen Analyse mit polyklonalen Antikörpern an 34 SCLC-Schnitten konnte der SST4 in 17,6% der untersuchten Präparate mit einer überwiegend schwachen Expressionsintensität ausgemacht werden. Sein Auftreten wurde dabei von den Autoren als rein zytoplasmatisch beschrieben, wohingegen die anderen SST-Subtypen auch membranständig exprimiert wurden. Eine zusätzliche, an 20 zufällig ausgewählten Präparaten der 34 zur Verfügung stehenden SCLC-Proben durchgeführte PCR ergab eine SST4-mRNA-Expression in 10% der untersuchten Tumore, wobei diese auch in den SST4-positiven Proben als quantitativ gering bewertet wurde (Kaemmerer et al. 2015a).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse können die bisherigen Beobachtungen eines sehr geringen Vorkommens des SST4 in nur wenigen SCLCs bestätigen: Von den neun im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewerteten SCLC-Präparate zeigten sich acht ohne signifikante SST4-Expression. Nur in einem der Schnitte konnte eine geringgradige Anfärbung verzeichnet werden. Insgesamt wurde ein durchschnittlicher IRS von 0,78 ermittelt.

Unter Berücksichtigung aller vorhandenen Daten scheint dem SST4 somit keine bedeutsame Rolle im SCLC zuzukommen.

Die zehn untersuchten Schnitte der menschlichen **Nebenschilddüsenadenome** erreichten in den immunhistochemischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit einem mittleren IRS von 9,35 mit Abstand die höchste durchschnittliche SST4-Positivität unter den untersuchten Tumorentitäten. So konnte eine SST4-Expression in allen Präparaten verzeichnet und mehr als sieben der Präparate als intensiv SST4-exprimierend eingeordnet werden. Dabei wurde ein sowohl zytoplasmatisches als auch membranständiges Immunsignal beobachtet.

Zum Vergleich mit den vorliegenden Ergebnissen wurde erneut die sehr umfassende Studie von Storvall et al. (2019) herangezogen. Die Autoren beschreiben hier ein insbesondere zytoplasmatisches und nur in geringem Maße membranständiges Auftreten aller SST-Subtypen in den von ihnen untersuchten Tumoren, wobei sie eine deutlich höhere Expression der SST-Subtypen SST2, SST3, SST4 und SST5 in den Nebenschilddrüsenkarzinomen als in den Nebenschilddrüsenadenomen nachweisen konnten. Der stärkste Unterschied wurde dabei bei der SST5-Expression beobachtet, weshalb der Rezeptor als möglicher Biomarker

für die Bewertung der Malignität von Nebenschilddrüsentumoren diskutiert wurde (Storvall et al. 2019).

Die Beobachtungen der vorliegenden Untersuchung stimmen mit den Ergebnissen Storvall et al. (2019) bezüglich des Vorkommens des SST4 in Nebenschilddrüsenadenomen überein. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit eine intensivere SST4-Expression in den Nebenschilddrüsenadenomen als in den Untersuchungen von Storvall et al. dokumentiert werden. Auch konnte in der vorliegenden Arbeit eine deutliche membranständige Anfärbung neben der zytoplasmatischen Immunreaktion gesehen werden, während Storvall et al. die membranständige Anfärbung in ihren Ergebnissen als eher vernachlässigbar eingeordnet hatten.

Aufgrund dieser ersten vielversprechenden Ergebnisse bezüglich der Expression der SST-Subtypen in Nebenschilddrüsenadenomen und -karzinomen und ihrer möglichen Bedeutung als Biomarker oder als medikamentös oder strahlentherapeutisch nutzbare Zielstruktur bei inoperablen Tumoren der Nebenschilddrüse, sind weitere Studien mit größeren Fallzahlen und unter Einbeziehung der klinischen Daten der Patienten wünschenswert.

Das **follikuläre** und das **papilläre Schilddrüsenkarzinom** gehören zur Gruppe der differenzierten Schilddrüsenkarzinome. Sie zeichnen sich durch einen eher benignen Verlauf aus (Heston und Wahl 2010).

In einer in der Literatur beschriebenen PCR-Analyse konnte die SST4-mRNA lediglich in einer sehr geringen Menge und nur in wenigen Exemplaren der 20 untersuchten papillären Schilddrüsenkarzinome und in keiner der 20 evaluierten Proben von follikulären Schilddrüsenkarzinomen nachgewiesen werden. Der SST4 stellte in dieser Untersuchung den mit Abstand am geringsten exprimierten SST-Subtypen dar, wohingegen für den SST2 und den SST3 sogar eine Überexpression in den papillären Schilddrüsenkarzinomen festgestellt werden konnte (Klagge et al. 2010).

In der Literatur lassen sich auch immunhistochemische Untersuchungen mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern finden, wie eine Studie an Gewebeproben von 47 nicht-medullären Schilddrüsenkarzinomen, von denen 38 als papilläre Schilddrüsenkarzinome und vier als follikuläre Schilddrüsenkarzinome eingeordnet worden waren. Als negativ gewertet wurde eine Anfärbung von weniger als 5% der Zellen, als fokal positiv eine Anfärbung von 5-20% der Zellen. Waren mehr als 20% der Zellen angefärbt, wurde die Probe als „stark positiv“ klassifiziert. Der SST4 konnte in dieser Untersuchung in 38% der analysierten Tumorgewebeproben gefunden werden. Er wurde vor allem als „fokal positiv“ vorliegend bewertet. Passend zu den mRNA-Ergebnissen von Klagge et al. wurden der SST2 und SST3 in allen analysierten Präparaten nachgewiesen und vorwiegend als „stark positiv“ exprimiert bewertet (Pazaitou-Panayiotou et al. 2012).

Eine weitere immunhistochemische Analyse mit polyklonalen Antikörpern, welche an insgesamt 93 Tumorpräparaten von 67 papillären und 26 follikulären Schilddrüsenkarzinomen vorgenommen worden war, nutzte zur Bewertung ebenfalls den IRS-Score nach Remmele und Stegner, schätzte jedoch die Punktezahlen von 0 als negativ, 1-4 als schwach positiv, 5-8 als moderat positiv und 9-12 als stark positiv ein. In dieser Studie wurden 75% der Tumore als SST4-negativ, 10% als schwach positiv, 7% als moderat positiv und 8% als stark positiv eingeschätzt. Anders als in der Studie von Pazaitou-Panayiotou et. al stellte in dieser Untersuchung der SST5 den in den papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinomen am geringsten exprimierten SST-Subtyp dar (Mussig et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnte in drei der zehn Präparate der follikulären Schilddrüsenkarzinome eine geringe bis mäßige SST4-Expression verzeichnet werden. Bei den papillären Schilddrüsenkarzinomen konnte bei sechs der elf Präparate eine geringe zytosolische Immunreaktion beobachtet werden. Bei beiden Entitäten lag der durchschnittliche IRS aller Präparate mit 2,3 bzw. 2,05 jedoch unter 3, so dass sie insgesamt als SST4-negativ gewertet wurden.

Unsere Ergebnisse zum papillären Schilddrüsenkarzinom passen gut zu den bereits vorhandenen Literaturangaben. Zwar fanden wir einen Hinweis auf ein SST4-Vorkommen in etwas mehr als der Hälfte der Präparate, jedoch scheint diese SST4-Expression meist nur in einer sehr geringen Intensität vorzukommen, sodass die Tumorentität insgesamt als SST4-negativ bewertet wurde.

Auch die Ergebnisse zum follikulären Schilddrüsenkarzinom stehen weitestgehend im Einklang mit den bisherigen Untersuchungen. Zwar konnten wir, im Gegensatz zu den mRNA-Analysen von Klagge et al, den SST4 in 30% der Präparate nachweisen, doch war die Expressionsstärke auch hier als eher gering bis moderat zu bewerten, wie es auch in den Studien von Pazaitou-Panayiotou et al. und Mussig et al. für die gesamte Entität der differenzierten Schilddrüsenkarzinome beschrieben worden war.

Vereinzelt stark SST4-exprimierende Präparate, wie sie bei Mussig et al. vorgelegen hatten, fanden wir weder bei den papillären noch bei den follikulären Schilddrüsenkarzinomen. Dies könnte auf die deutlich geringere Menge an untersuchten Präparaten in der vorliegenden Arbeit oder aber auf unspezifische Kreuzreaktionen des von Mussig et al. verwendeten polyklonalen Antikörpers zurückzuführen sein, welche zu einer verstärkten Anfärbung der Präparate geführt haben könnten.

Die **Medullären Schilddrüsenkarzinome** machen einen Anteil von etwa 1-2% aller Schilddrüsenkarzinome aus. Sie haben ihren Ursprung in den parafollikulären C-Zellen und werden den neuroendokrinen Tumoren zugerechnet (Giovannella et al. 2020).

Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern hatten den SST3 in 81%, den SST5 in 54,8%, den SST1 in 45,2% und den SST2 in 28,6% der 42 dort evaluierten medullären Schilddrüsenkarzinome auffinden können. Signifikant positiv korrelierte dabei das SST1-Auftreten mit dem Ansprechen auf eine initiale protokollgerechte Tumorbehandlung. Die SST4-Expression war in dieser Studie nicht untersucht worden (Kendler et al. 2017). In einer anderen Studie konnte eine positive Korrelation zwischen der SST2-Expression und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen, einem höheren Staging und einer fortgeschrittenen Dysplasie der Tumore gefunden werden. Das Vorkommen des SST5 korrelierte in dieser Untersuchung ebenfalls positiv mit dem Staging und dem Grad der Entartung (Herac et al. 2016).

Bei immunhistochemischen Untersuchungen mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern konnte der SST4 in lediglich 4% der über 50 analysierten Präparate von medullären Schilddrüsenkarzinomen nachgewiesen werden. Der SST4 war in dieser Studie laut den Autoren der einzige SST-Subtyp, welcher kein gehäuftes Vorkommen im medullären Schilddrüsenkarzinom aufwies (Papotti et al. 2001).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Papotti et al. (2001) konnten in der vorliegenden Arbeit bei sechs der sieben angefärbten Präparate medullärer Schilddrüsenkarzinome eine SST4-Positivität verzeichnet werden. Der mittlere IRS-Wert aller Tumore lag bei 5,18 und damit deutlich oberhalb des Schwellenwertes von 3. Das Vorkommen des SST4 in den verschiedenen Schnitten wurde dabei als eher zytoplasmatisch bewertet und unterlag einer großen Variabilität hinsichtlich der Anzahl der SST4-exprimierenden Zellen und der Färbeintensität.

Die Unterschiede in den Ergebnissen zwischen der vorliegenden Untersuchung und der Arbeit von Papotti et al. könnten durch eine deutlich höhere Spezifität des in der vorliegenden Untersuchung verwendeten monoklonalen Antikörpers im Vergleich zu dem von Papotti et al. eingesetzten polyklonalen Antikörper erklärt werden. Eine höhere Spezifität von monoklonalen im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern ist, insbesondere auch am Beispiel der SST als Target, bereits vielfach nachgewiesen und beschrieben worden (Fischer et al. 2008, Kaemmerer et al. 2013).

Insgesamt könnte die weitere Erforschung der SST-Expression in den medullären Schilddrüsenkarzinomen durchaus von Interesse sein, um die Frage zu beantworten, ob sich die Rezeptoren als mögliche Zielstruktur für die Diagnostik oder die Therapie dieser immer noch mit einer sehr schlechten Prognose vergesellschafteten Tumorentität eignen könnten. Ebenfalls interessant wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung, ob, wie bei den anderen SST-Subtypen, das SST4-Auftreten mit anderen Markern, wie dem Grading oder Staging des Tumors korreliert.

Die immunhistochemische Analyse der acht untersuchten Präparate des **anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms** im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab eine SST4-Positivität für genau die Hälfte der Schnitte. Der durchschnittliche IRS-Wert für diese Tumorentität lag bei 3,06 und damit leicht oberhalb des Schwellenwertes.

Klagge et al. hatten in ihren mRNA-Analysen eine erhöhte Expression des SST2 im anaplastischen Schilddrüsenkarzinom im Vergleich zu gesundem Schilddrüsengewebe festgestellt. Auch Untersuchungen mittels PET/CT und den Radioligand-gekoppelten SSA Octreotid und Lanreotid konnten durch eine vermehrte Aufnahme in 4 von 5 untersuchten anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen eine Expression des SST2 und auch des SST5 bestätigen (Traub-Weidinger et al. 2015).

Eine mRNA-Analyse aus dem Jahr 1997 hatte an zwei Zelllinien des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms, im Gegensatz zu einem deutlichen Auftreten des SST1, SST3 und SST5, keine Expression des SST4 feststellen können. Hingegen zeigte sich in einer von zwei humanen Zellkulturen von anaplastischen Schilddrüsentumoren, welche als Xenograft-Transplantate in Mäuse verpflanzt worden waren, ein geringes Auftreten des SST4 (Ain et al. 1997).

Weitere Untersuchungen zur SST-Expression in den anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

Das anaplastische Schilddrüsenkarzinom ist zwar nur für 1-2% aller malignen Schilddrüsentumore verantwortlich, besitzt jedoch die höchste Letalität unter diesen Tumoren. Während konventionelle Chemotherapeutika nur eine begrenzte Symptomlinderung bewirken können, konnte bislang trotz jahrelanger Suche nach geeigneten spezifischen pharmakologischen Targets noch keine offizielle Therapieempfehlung ausgesprochen werden. Die derzeitige Behandlung des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms besteht aus einer Kombination aus Chirurgie, Chemo- und Radiotherapie (Molinaro et al. 2017). Daher existiert nach wie vor ein dringender Bedarf an neuen Therapieoptionen. Die weitere Untersuchung der SST-Expression in dieser Tumorentität, besonders in Hinblick auf einen möglichen diagnostischen oder therapeutischen Einsatz von Somatostatin-Analoga, ist sicherlich empfehlenswert; eher fraglich ist jedoch, ob der SST4-Subtyp dabei eine Rolle spielen wird.

Nakayama et al. hatten 2010 im Rahmen einer Publikation unter anderem die Ergebnisse ihrer mRNA-Analysen veröffentlicht, mit Hilfe derer sie die Expression der verschiedenen SST-Subtypen in **Pankreaskarzinomen** untersucht hatten. Der SST4 zeigte dabei ein sehr geringes Vorkommen in allen 5 untersuchten Adenokarzinomen des Pankreas, wobei die mRNA-Konzentration in einigen Fällen sogar unter der Nachweisschwelle gelegen hatte (Nakayama et al. 2010).

In immunohistochemischen Untersuchungen, welche mit monoklonalen Antikörpern gegen den SST1, den SST2, den SST3 und den SST5 sowie mit einem polyklonalen Antikörper gegen den SST4 vorgenommen worden waren, wurde ebenfalls der IRS-Score nach Remmele und Stegner genutzt und ein Wert von größer gleich 3 als positiv für den jeweiligen SST gewertet. In diesen Analysen war der SST1 der am meisten exprimierten SST-Subtyp. Er wurde in 42,3% der 26 untersuchten Adenokarzinome des Pankreas vorgefunden. Ein Vorkommen des SST3 und des SST5 wurde insbesondere in den Tumorgefäßen beobachtet. Der SST4 wurde, als einziger SST-Subtyp, als rein zytoplasmatisch vorliegend beschrieben. Jedoch wurde keines der Präparate als SST4-positiv mit einem IRS-Wert größer gleich 3 bewertet (Kajtazi et al. 2019).

Bei den immunohistochemischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit dem neuen monoklonalen Antikörper 7H49L61 konnte dagegen eine SST4-Positivität bei zehn der insgesamt elf ausgewerteten Tumorpräparate von Pankreaskarzinomen festgestellt werden. Die SST4-Expression wurde mit einem durchschnittlichen IRS von 6,27 insgesamt als mäßig stark eingestuft.

Unsere Ergebnisse stehen den bisherigen Literaturangaben somit kontrovers gegenüber. Verglichen mit den Angaben von Kajtazi et al. fanden wir den SST4 nicht nur in über 90% der ausgewerteten Adenokarzinome des Pankreas, sondern beobachteten zudem auch ein deutlich membranständiges Vorliegen des Rezeptors parallel zu einer zytoplasmatischen Expression. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die höhere Spezifität des von uns eingesetzten monoklonalen Antikörpers dabei eine Rolle spielt.

Auch im Vergleich mit den mRNA-Analysen von Nakayama et al. erzielten wir eher gegensätzliche Ergebnisse. Diese könnten jedoch unter anderem mit methodischen Problemen zu erklären sein. So weisen Nakayama et al. in ihrer Diskussion darauf hin, dass sie ihre Untersuchungen an in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Präparaten durchgeführt hatten, was eine Amplifikation der mRNA beim Vorgang der PCR erschwert oder verhindert haben könnte.

Eine weitere Untersuchung der Adenokarzinome des Pankreas hinsichtlich einer SST4-Expression scheint jedoch aufgrund unserer vielversprechenden Ergebnisse sehr sinnvoll. Insbesondere Studien an großen Serien von histologisch gut charakterisierten Tumorproben könnten helfen, die Bedeutung des SST4 in dieser Tumorentität und die diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten, die sich dadurch eröffnen könnten, aufzuklären.

Das **hepatozelluläre Karzinom(HCC)** stellt den häufigsten primären Lebertumor dar. Weltweit ist es die zweithäufigste Krebs-assoziierten Todesursache, da es mit sehr begrenzten Behandlungsmöglichkeiten und einer schlechten Prognose einhergeht (Kim et al. 2017).

Das **cholangiozelluläre Karzinom (CCC)** ist eine selten auftretende Malignität des Gallengangsystems. Durch fehlende Frühsymptome oder Screening-geeignete Tumormarker wird es in einem Großteil der Fälle erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Es ist daher ebenfalls mit einer äußerst schlechten Prognose verbunden (Vogel und Saborowski 2017).

Zahlreiche Untersuchungen über die SST-Expression in humanen hepatozellulären Karzinomen waren zu sehr unterschiedlichen und teils kontroversen Ergebnissen gekommen (Blaker et al. 2004, Reynaert et al. 2004, Verhoef et al. 2008, Pivonello et al. 2014, Xie et al. 2015). Kaemmerer et al. (2017) hatten dies vor allem mit der Verwendung polyklonaler Antikörper unterschiedlicher Herstellerfirmen mit ungenügender Spezifität begründet. Die Autoren hatten deshalb eine erneute immunhistochemische Evaluation der SST-Expression in HCC mit Hilfe von gut charakterisierten monoklonalen Antikörpern für den SST1, den SST2, den SST3 und den SST5 sowie mit einem polyklonalen Antikörper für den SST4 vorgenommen. Im Ergebnis konnte keine nennenswerte Expression des SST4 sowie ein nur sehr geringes Vorkommen der SST1, SST2, SST3 und SST5 verzeichnet werden (Kaemmerer et al. 2017a).

Kaemmerer et al. (2017) hatten zudem auch die SST-Expression in Cholangiozellulären Karzinomen untersucht. Hier zeigte sich im Vergleich zum HCC eine deutlich höhere Expression des SST1, des SST2 und des SST5, jedoch war auch hier kein Vorkommen des SST3 und des SST4 nachweisbar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie mit dem neuen monoklonalen Antikörper 7H49L61 ergaben eine geringe Anfärbung in nur wenigen HCC-Präparaten und einen durchschnittlichen IRS von 1,55 und damit insgesamt eine SST4-Negativität für diese Tumorentität. Unsere Resultate bestätigen also die Ergebnisse der Untersuchung von Kaemmerer et al. (2017). Ein bedeutsames Vorkommen des SST4 im HCC kann somit weitestgehend ausgeschlossen werden.

Beim CCC, hingegen, konnte in den vorliegenden Analysen eine sehr heterogene Immunreaktion in den verschiedenen Präparaten vorgefunden werden. Während zwei Drittel der untersuchten Schnitte kein signifikantes Vorkommen des SST4 aufwiesen, stellte sich ein Drittel mit einer äußerst intensiven SST4-Expression dar, welche für den am Ende insgesamt SST4-positiven IRS-Score von 3,7 für die Tumorentität des CCC verantwortlich war.

Unsere Ergebnisse stimmen folglich mit der von Kaemmerer et al. (2017) beschriebenen SST4-Negativität des CCC nicht überein. Dies könnte vor allem in einer geringeren Spezifität des von Kaemmerer et al. verwendeten polyklonalen Antikörpers gegenüber monoklonalen Antikörpern begründet liegen, auf welche Kaemmerer et al. in ihrer entsprechenden Publikation sowie in anderen Arbeiten hinweisen. Zugleich scheint eine Expression des SST4 nur in einem geringen Anteil von CCCs aufzutreten, in diesen jedoch in sehr hohem Umfang.

Aufgrund der äußerst schlechten Prognose und den wenigen verfügbaren Therapieoptionen für diese Tumorerkrankung könnten weitere Studien bezüglich eines SST4-Vorkommens im CCC von großem Interesse für die weitere Erforschung der Erkrankung und ihrer Behandlungsansätze sein.

Das **Phäochromozytom** stellt eine Neoplasie des Nebennierenmarks oder, in selteneren Fällen, anderer Paraganglien dar. Phäochromozytome stehen in Verbindung mit einer unkontrollierten Überproduktion von Katecholaminen (Mundschenk et al. 2003).

Eine mRNA-PCR-Analyse beschrieb 2005 ein Vorkommen des SST4 in 20% der untersuchten Phäochromozytome (Ueberberg et al. 2005). Immunhistochemische Untersuchungen mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern konnten den SST4 in 5 der 52 für die Studie verfügbaren Phäochromozytome von 35 unterschiedlichen Patienten vorfinden. Sein Vorkommen wurde von den Autoren als rein zytoplasmatisch beschrieben und im Vergleich zu dem in über 90% der Phäochromozytome vorliegenden SST3 als sehr gering eingeschätzt (Mundschenk et al. 2003).

Zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich einer SST4-Expression waren immunhistochemische Untersuchungen mit polyklonalen SST4-Antikörpern an einer großen Serie von Paragangliomen gekommen. Paragangliome stellen mit den Phäochromozytomen eng verwandte neuroendokrine Neoplasien dar, welche extra-adrenalen Ursprungs sind und nicht notwendigerweise mit einer Katecholamin-Überproduktion assoziiert sind. Der SST4 wurde in 13 % der 66 Tumore von 55 verschiedenen Patienten vorgefunden, wobei sein Vorkommen ebenfalls als rein zytoplasmatisch beschrieben wurde. Der SST4 stellte in dieser Untersuchung den am geringsten exprimierten SST-Subtypen dar, wobei anzumerken ist, dass gegen die anderen SST monoklonale Antikörper verwendet wurden. Den in 89% der Tumore und damit am meisten exprimierten SST-Subtypen stellte in dieser Studie der SST2A dar (Kaemmerer et al. 2017b).

Hingegen zeigten sich in den immunhistochemischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit alle sieben untersuchten Präparate humaner Phäochromozytome SST4-positiv und es konnte insgesamt ein mäßig hoher durchschnittlicher IRS von 6,5 vergeben werden. Hierbei fiel insbesondere eine SST4-Expression an den Wachstumsrändern bei tendenziell SST4-negativem Tumorerinneren auf.

Die vorliegenden Ergebnisse unterscheiden sich somit deutlich von den bisherigen Literaturangaben, was unter anderem wiederum auf die höhere Spezifität des monoklonalen Antikörpers 7H49L61 im Vergleich zu den in den anderen Arbeiten verwendeten polyklonalen Antikörpern zurückzuführen sein könnte. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, welche eine deutlich stärkere SST4-Expression im Phäochromozytom zeigen, als bisher angenommen, wären weiterführende Untersuchungen mit einer möglichst

großen Anzahl an Proben durchaus erstrebenswert, um ein besseres Verständnis über die Rolle und Funktion des SST4 in dieser Tumorentität erlangen zu können.

Das **klarzellige Nierenkarzinom** wird durch seinen meist symptomlosen Wachstumsprozess oft erst in fortgeschrittenen Stadien entdeckt. Die Behandlungsmöglichkeiten sind sehr eingeschränkt, die Prognose dementsprechend schlecht (Freudenberg et al. 2008, Hoog et al. 2018).

Studien über den diagnostischen und therapeutischen Einsatz von Radioligand-gekoppeltem Octreotid kamen zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen. Eine gewisse Expression des SST2 scheint jedoch im klarzelligen Nierenkarzinom vorhanden zu sein, da vereinzelt Erfolge verzeichnet werden konnten (Edgren et al. 1999, Hoog et al. 2018).

Der SST4 konnte in einer mRNA-Analyse nur sehr sporadisch im klarzelligen Nierenkarzinom aufgefunden werden (Vikic-Topic et al. 1995).

Dies deckt sich mit den vorliegenden Ergebnissen, nach denen keines der acht immunhistochemisch gefärbten Präparate als SST4-positiv eingestuft werden konnte.

Zusammenfassend scheint der SST4 in klarzelligen Nierenkarzinomen nicht in einem bedeutenden Ausmaß exprimiert zu sein.

Das **Harnblasenkarzinom** ist nach dem Prostatakarzinom die zweithäufigste Malignität des Urogenitaltrakts. Der Verlauf der Erkrankung kann individuell sehr variabel sein und verlässliche prognostische Marker fehlen bislang (Karavitakis et al. 2014, Maas et al. 2020).

Erste mRNA-Analysen zur SST-Expression im Harnblasenkarzinom hatten den SST4 in 12 von insgesamt 34 Tumorschnitten nachweisen können (Karavitakis et al. 2014).

Maas et al. hatten 2020 eine Serie von Gewebeproben aus 103 muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern auf ein SST-Vorkommen hin untersucht. Verwendet wurde hierbei für den SST4-Nachweis ein monoklonaler anti-SST4-Antikörper der Novartis AG in Basel, Schweiz. Die Anfärbung wurde nach dem H-Score bewertet, bei welchem jeweils die Prozentsätze der angefärbten Zellen mit der Intensität der jeweiligen Anfärbung multipliziert und diese Werte addiert werden. Die Intensität der Anfärbung kann einen Wert von 0 als negativ bis 3 als intensiv angefärbt annehmen. Insgesamt kann der H-Score ein Minimum von 0 und ein Maximum von 300 Punkten erreichen. Bei einem Wert von 0 bis 50 wird das Präparat als negativ, von 51 bis 100 als schwach positiv, von 101 bis 200 als mäßig positiv und von 201 bis 300 als stark positiv eingeordnet.

Die Ergebnisse von Maas et al. ergaben für das Vorkommen des SST4 in den Proben der untersuchten muskelinvasiven Urothelkarzinome einen Medianwert von 200, welcher als mäßig bis stark positiv einzuordnen ist. Bei den vergebenen Bewertungen konnte dabei die gesamte Streubreite von 0 bis 300 Punkten beobachtet werden. Die Autoren beschrieben,

dass die SST4-Expression mit dem Grad der Entartung abzunehmen schien. Sie konnten jedoch keine signifikante Korrelation zwischen dem SST4-Auftreten und dem N- oder M-Status der Tumore ermitteln. Allerdings zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der SST3-Expression und dem Überleben der Patienten, wobei das SST3-Vorkommen wiederum signifikant positiv mit der Präsenz des SST4 korrelierte (Maas et al. 2020).

In den vorliegenden Analysen präsentierten sich sechs der sieben Präparate als SST4-positiv, allerdings ergab der IRS mit einem durchschnittlichen Wert von 4,68 insgesamt nur eine niedrige SST4-Expressionsintensität für die Harnblasenkarzinome. Mit 85,7% wurde in der vorliegenden Arbeit dennoch eine prozentual deutlich höhere Anzahl an positiven Fällen als in den mRNA-Analysen von Karavitakis et al., jedoch ein geringeres Expressionsergebnis im Vergleich zu den Analysen von Maas et al. (2020) gefunden.

Insgesamt scheint es ein häufiges Vorkommen mit einer individuell sehr unterschiedlichen Expressionsstärke des SST4 in den Harnblasenkarzinomen zu geben. Weiterführende Studien bezüglich des SST-Vorkommens, insbesondere auch des SST4, in dieser Tumorentität könnten möglicherweise neue Erkenntnisse für das diagnostische, prognostische und therapeutische Vorgehen bei dieser Erkrankung liefern und wären deshalb wünschenswert.

In Untersuchungen mit polyklonalen Antikörpern war der SST4 zwar neben allen anderen SST-Subtypen in den Zellen des gesunden Magens gefunden worden, jedoch gibt es bisher keine Literaturangaben über die Untersuchung von **Magenkarzinomen** bezüglich einer SST4-Expression (Taniyama et al. 2005).

Passend zu dem Nachweis des SST4 in allen drei untersuchten gesunden Magenschnitten von Taniyama et al. (2005) sowie zu der Beobachtung einer intensiven Färbung der Drüsenzellen im gesunden Magengewebe in der vorliegenden Untersuchung, wurden auch die neun untersuchten Präparate des Magenkarzinoms allesamt als SST4-positiv gewertet. Die Anfärbung konnte, ebenso wie im gesunden Gewebe, als zytoplasmatisch und membranständig beschrieben werden. Mit einem durchschnittlichen IRS-Wert von 8,06 zeigten die Magenkarzinome insgesamt eine mäßig hohe SST4-Expression.

Aufgrund dieser ersten vielversprechenden Ergebnisse wären weiterführende Studien über das Vorkommen der verschiedenen SST-Subtypen, insbesondere auch des SST4, in den unterschiedlichen Tumorstadien des Magenkarzinoms, auch vor dem Hintergrund einer möglichen prognostischen, diagnostischen, oder therapeutischen Bedeutung, von großem Interesse.

Auch über ein SST4-Vorkommen in **Kolonkarzinomen** liegen noch keine Literaturangaben vor, sodass die vorliegende Arbeit die erste genauere SST4-Expressionsanalyse in dieser Tumorentität darstellt. In gesundem menschlichem Kolon hatten Taniyama et al. (2005) in

ihren immunhistochemischen Untersuchungen mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern den SST4 in keinem der drei untersuchten Präparate nachweisen können.

In den vorliegenden Analysen zeigten sich die Kolonkarzinome mit einem IRS-Mittelwert von 3,07 insgesamt nur gering SST4-positiv. Beobachtet wurde insbesondere ein eher regionales Auftreten der immunhistochemischen Reaktion, sodass geschlussfolgert werden kann, dass weite Tumorbereiche der Kolonkarzinome offensichtlich keine SST4-Expression aufweisen. Vor dem Hintergrund der bereits breit aufgestellten diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten sowie der in dieser Untersuchung als gering eingeschätzten SST4-Expression in dieser Tumorentität erscheint eine weitere Erforschung des SST4 in Kolonkarzinomen daher eher wenig lohnenswert.

Die Behandlung von **Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST)** erfolgt in Linie mit Tyrosinkinase-Inhibitoren. Zunehmend kommt es dabei jedoch zu einer Resistenzentwicklung des Tumors gegenüber den eingesetzten Chemotherapeutika. Auf der Suche nach alternativen Therapieansätzen hatten Arne et al. (2013) das Vorkommen der verschiedenen SST-Subtypen in 34 GISTs mit Hilfe von mRNA-Analysen, polyklonalen Antikörpern und Radioligand-gekoppelten SSA untersucht. Der SST4 konnte hierbei in der mRNA-Analyse nur in einem geringen Prozentsatz und in der Immunhistochemie mit polyklonalen Antikörpern in keinem der 34 GIST nachgewiesen werden. Damit stellte der SST4 den in dieser Studie am wenigsten exprimierten SST-Subtypen in GIST dar, während der SST1 und der SST2 mit allen drei Methoden in einem Großteil der Tumore nachgewiesen werden konnten, so dass eine Radioligand-gekoppelte SSA-Therapie für ausgewählte Patienten von den Autoren als sinnvoll diskutiert wurde (Arne et al. 2013).

In den vorliegenden immunhistochemischen Analysen mit dem neuen monoklonalen Antikörper 7H49L61 konnte, im Gegensatz zu den Befunden von Arne et al. (2013), eine SST4-Positivität bei 8 der 10 untersuchten GIST und ein durchschnittlicher IRS von 5,03 festgestellt werden, wobei sich jedoch mit einer Spannweite in den IRS-Werten von 0 bis 10 eine sehr große Variabilität in der SST4-Expression zwischen den untersuchten Präparaten zeigte. Während sich einige Tumore komplett SST4-negativ präsentierten, wiesen andere GIST-Präparate eine vielversprechend starke immunhistochemische Reaktion, insbesondere an den Wachstumszonen der Tumore, auf. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanzen zwischen den vorliegenden Ergebnissen und denen von Arne et al. (2013) könnte die deutlich bessere Spezifität monoklonaler im Vergleich zu polyklonalen Antikörpern darstellen (Arne et al. 2013, Kaemmerer et al. 2013).

Insbesondere im Hinblick auf die steigende Anzahl von Resistenzen gegenüber den Tyrosinkinase-Inhibitoren, wären aufgrund der vorliegenden Ergebnisse weiterführende Studien zur SST-Expression, insbesondere des SST4, in GIST auf jeden Fall wünschenswert.

Das Vorkommen des SST4 im **Mammakarzinom** ist vergleichsweise gut untersucht und wurde von mehreren unabhängigen Studien bestätigt.

Bei PCR-Analysen konnte die mRNA des SST4 in 76% der 98 untersuchten Präparate duktaler Mammakarzinome nachgewiesen werden. Es konnte außerdem eine signifikant positive Korrelation zwischen der SST4-Expression und der Expression von Östrogen-Rezeptoren (ER) festgestellt werden (Kumar et al. 2005).

Immunhistochemische Analyse mittels polyklonaler Antikörper bestätigten das Auftreten des SST4 in 76% der im Rahmen der Untersuchung verfügbaren Brustkrebs-Präparate. Auch diese Studie fand eine signifikante Korrelation zwischen dem SST4-Vorkommen und der ER-Expression (Fрати et al. 2014).

Übereinstimmend mit diesen bisherigen Ergebnissen fand eine weitere immunhistochemische Analyse den SST4 mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern in über 70% der 160 analysierten Proben von Mammakarzinomen. Der SST4 wurde in dieser Untersuchung, wie auch in der von Frати et al (2014), als der im höchsten Umfang exprimierte SST-Subtyp im Mammakarzinom beschrieben (Zou et al. 2019).

In der vorliegenden immunhistochemischen Analyse konnte der SST4 in sechs der neun Präparate aufgefunden werden. Die Ergebnisse sind somit prozentual gut vergleichbar mit den bisherigen Literaturangaben. Der errechnete IRS-Mittelwert ergab mit 3,47 insgesamt eine geringe SST4-Positivität für das Mammakarzinom, wobei die untersuchten Präparate maximal als mäßig SST4-exprimierend einzuordnen waren.

Weitere Studien über die diagnostische und prognostische Bedeutung des SST4, insbesondere im Zusammenhang mit einer Östrogenrezeptor-Überexpression im Mammakarzinom, sind aufgrund der insgesamt vielversprechenden Ergebnisse sowie der unveränderten Aktualität der Erkrankung durchaus von Interesse.

Während das Vorkommen der anderen SST-Subtypen in **Ovarialkarzinomen** recht gut untersucht ist, wurde die Analyse der Expression des SST4 in dieser Tumorentität in vielen Studien vernachlässigt. Mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern wurde der SST4 in einer immunhistochemischen Studie in 8 von insgesamt 47 analysierten Präparaten humaner Ovarialkarzinome aufgefunden, wobei der SST4 mit einem Prozentsatz von 17% den am wenigsten exprimierten SST-Subtypen in der untersuchten Kohorte darstellte. Sein Auftreten wurde als membranständig und zytoplasmatisch beschrieben und konnte von den Autoren in keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Patientenalter oder der Tumorhistologie gebracht werden (Schulz et al. 2002).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemachten Beobachtungen passen mit den Ergebnissen von Schulz et al. gut überein: Von neun Ovarialkarzinomen zeigten sich drei

Präparate SST4-positiv. Hierbei wiesen zwei Präparate eine mäßige Anfärbung und eines eine geringe immunhistochemische Reaktion auf. Die SST4-Expression trat dabei membranständig wie auch zytosolisch auf. Insgesamt wurde in der vorliegenden Arbeit für die Ovarialkarzinome ein durchschnittlicher IRS von 2,55 errechnet, was unterhalb des gewählten Schwellenwertes für eine Positivität liegt.

Die bisherigen Ergebnisse zusammengefasst, scheint ein bedeutsames SST4-Vorkommen in dieser Tumorentität nicht vorzuliegen.

Auch über die SST4-Expression in **Endometriumkarzinomen** und in **Zervixkarzinomen** existieren nur wenige Literaturangaben. Mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern waren beide Tumorentitäten auf das Vorkommen der einzelnen SST-Subtypen hin untersucht worden. Im Ergebnis dieser Analysen konnte eine SST4-Positivität nur für eines von 28 Endometriumkarzinom-Präparaten und für keines der 21 in die Studie eingeschlossenen Zervixkarzinom-Präparate festgestellt werden (Schulz et al. 2003).

Auch die vorliegende Arbeit ergab insgesamt eine SST4-Negativität für beide Tumorentitäten, wobei die errechneten IRS-Mittelwerte bei 1,53 für das Endometriumkarzinom und bei 1,40 für das Zervixkarzinom lagen.

Zusammenfassend stimmen die vorliegenden Ergebnisse mit den Angaben von Schulz et al. überein. Eine maßgebliche SST4-Expression scheint demzufolge weder im Endometriumkarzinom noch im Zervixkarzinom vorzukommen.

Bisherige Studien über ein SST4-Vorkommen in **Prostatakarzinomen** sind in ihren Resultaten sehr unterschiedlich ausgefallen:

So wurde im Ergebnis von mRNA-Analysen über ein Vorkommen des SST4 in 12 von 13 untersuchten Prostatakarzinomen berichtet. Dabei konnte eine SST4-Expression in den Epithelzellen im Gegensatz zu einer ebenfalls vorliegenden SST2-Expression hauptsächlich in den Stromazellen verzeichnet werden. Es wurde außerdem über eine vermehrte SST4-Expression in den maligne entarteten im Vergleich zu den benignen hyperplastischen Prostatazellen berichtet (Hansson et al. 2002).

Immunhistochemische Untersuchungen wiesen eine um 20-70% signifikant verminderte Expression aller fünf SST-Subtypen in Hormontherapie-resistenten im Vergleich zu Hormontherapie-responsiven Prostatakarzinomen nach, wobei sie in diesem Rahmen ein Vorliegen des SST4 sowohl im Zytoplasma als auch auf der Zellmembran sowie im Zellkern der Hormontherapie-sensiblen Prostatakarzinomzellen beschrieben (Mazzucchelli et al. 2011).

Hingegen zeigten Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern ein generell geringes Vorkommen des SST1, SST2, SST3 und SST5 in den maligne entarteten Zellen des

Prostatakarzinoms, allerdings ohne auf den SST4 einzugehen. Es wurde zudem eine positive Korrelation zwischen der SST-Expression und dem Grading und Staging der Tumore festgestellt, was wiederum mit den Ergebnissen von Hansson et al. (2002) über eine vermehrte SST2- und SST4-Expression in den Prostatakarzinomen im Vergleich zum benignen hyperplastischen Prostatagewebe gut übereinstimmt (Werner et al. 2020).

In den in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen immunhistochemischen Färbungen mit dem neuen monoklonalen Antikörper 7H49L61 konnte ein sehr variables Auftreten des SST4 in den insgesamt 12 ausgewerteten Präparaten des Prostatakarzinoms beobachtet werden. Die Hälfte der Präparate zeigte sich gänzlich SST4-negativ. Hingegen konnte in einem Drittel der Präparate ein mäßiges bis starkes Vorkommen des SST4 in den äußeren kubischen Epithelzellen verzeichnet werden, was im Einklang mit den Angaben von Hansson et al. (2002) steht. Ebenfalls in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Hansson et al. konnte keine SST4-Expression im Tumorstroma verzeichnet werden.

Insgesamt wurden die Prostatakarzinome mit einem gemittelten IRS von 2,20 als SST4-negativ gewertet. Allerdings könnte es einen gewissen Anteil an Tumoren mit einer deutlichen SST4-Expression geben (die Spannweite der IRS-Werte reichte von 0 bis 7,5). Die SST4-Expression könnte sich daher in bestimmten Fällen als diagnostisch, prognostisch oder therapeutisch bedeutsam erweisen, sodass hier sicherlich weitergehende Studien an größeren Fallzahlen und unter Einbeziehung der klinischen Daten der Patienten sinnvoll wären.

Im Rahmen von mRNA-Analysen konnte in den untersuchten Präparaten von **Hodentumoren** keine SST4-Expression aufgefunden werden, wobei sogar ein Verlust der SST4-Expression im Rahmen der Entartung des gesunden zum neoplastischen Gewebe sowohl für Seminome als auch für Nicht-Seminome berichtet wurde (Baou et al. 2001, Devouassoux-Shisheboran et al. 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwölf Präparate von Hodentumoren immunhistochemisch analysiert, für welche jedoch keine Daten über eine Zuordnung zu Seminomen oder Nicht-Seminomen vorlagen. Im Gegensatz zu den bisherigen Literaturangaben konnte dabei eine geringe SST4-Expression in einem Drittel der Präparate verzeichnet werden, wobei der Rezeptor in zwei Präparaten ein mäßig ausgeprägtes zytosolisches Auftreten zeigte. Insgesamt wurden die Hodentumore mit einem IRS-Mittelwert von 3,6 als gering SST4-positiv bewertet.

Vor dem Hintergrund der auch in der vorliegenden Arbeit im normalen Hodengewebe vorgefundenen Färbungen stützen die Ergebnisse insgesamt die von Devouassoux-Shisheboran et al. (2003) aufgestellte These, dass es mit einer fortschreitenden Zellentartung in den Hodentumoren zu einem Verlust der SST4-Expression kommt. Dies würde auch mit

den Ergebnissen von Baou et al. (2001) übereinstimmen, welche keine SST4-mRNA in den Hodentumoren finden konnten.

Das Ausmaß der SST4-Expression wäre daher möglicherweise bei Hodentumoren von prognostischer Bedeutung und weiterführende Untersuchungen gerade in diesem Zusammenhang interessant.

Die fälschliche Einordnung von Lymphomen bei Somatostatin-Analoga-PET/CT-Untersuchungen als neuroendokrine Tumore führte zu ersten Untersuchungen der SST-Expression in dieser Tumorentität. Bei PCR-Untersuchungen wurde dabei die mRNA des SST2 in einem Großteil der im Rahmen der Studie analysierten Lymphome entdeckt, wohingegen der SST3 und der SST5 nur selten aufgefunden werden konnten (Ruuska et al. 2018).

Harda et al. (2020) untersuchten fünfzehn verschiedene kindliche hämatologisch-onkologische Fälle mit Hilfe von mRNA-Analysen und konnten dabei den SST4 in einem Hodgkin-Lymphom nachweisen (Harda et al. 2020).

In der vorliegenden immunhistochemischen Analyse von zwölf Lymphom-Präparaten zeigte sich in zehn Präparaten eine mäßige bis stark ausgeprägte zytosolische SST4-Expression, insbesondere in den Tumorrand-nahen Wachstumszonen. Die gesamte Tumorentität wurde mit einem durchschnittlichen SST4-IRS von 6,02 bewertet, was einer mäßigen Expression entspricht.

Aufgrund der bisherigen Erkenntnisse scheint es sehr wahrscheinlich, dass der SST4 neben anderen SST-Subtypen sehr regulär und in größerem Umfang in Lymphomen exprimiert vorkommt. Weitere Studien mit einer großen Anzahl an Präparaten der unterschiedlichen Lymphom-Subentitäten wären daher sehr wünschenswert.

Das **Maligne Melanom** gehört unter anderem durch seine oftmals sehr frühzeitige Metastasierung sowie durch gelegentliche Fehldiagnosen aufgrund seiner teils variabel ausgeprägten Zellhistologie zu den aggressivsten und tödlichsten Hauttumoren. Zu den wichtigsten prognostischen Markern gehören die Tumordicke, die mittels des Breslow-Indexes erfasst wird, sowie die Mitoserate. Die Inzidenz des Malignen Melanoms steigt weltweit rapide an (Abbas et al. 2014).

In der Literatur gibt es noch keine Angaben zum Vorkommen des SST4 oder der anderen SST-Subtypen im Malignen Melanom.

Im Rahmen der immunhistochemischen Analysen der vorliegenden Arbeit konnte der SST4 in drei der fünf Präparate des Malignen Melanoms, sowohl zytoplasmatisch als auch membranständig vorliegend, beobachtet werden. Er war dabei insbesondere an den Proliferationsrändern und nicht in den Melanom-typischen Zellnestern zu finden. Mit einem

gemittelten IRS von 3,20 konnte insgesamt eine nur leichte SST4-Positivität für das Maligne Melanom verzeichnet werden.

Weitere Untersuchungen über eine generelle SST-Expression im Melanom könnten durchaus sinnvoll für das Sammeln weiterer Informationen über diese aggressive Tumorentität sein. Ebenfalls wären weitere Studien über die SST4-Expression an größeren Serien Maligner Melanome wünschenswert, um eine höhere Aussagekraft und einen besseren Erkenntnisstand über das Vorkommen des SST4 in dieser Tumorentität erlangen zu können.

6.3. Somatostatin-Rezeptor-4-Expression in neuroendokrinen Neoplasien

6.3.1. Allgemeine Patientendaten und klinische Daten

Die Patienten der vorliegenden Untersuchung wiesen ein mittleres Alter von 58,5 Jahren auf. Vergleichbare Angaben finden sich in der Literatur. Hier wird ein durchschnittlicher Diagnosezeitpunkt für GEP-NEN zwischen dem 50. und dem 60. Lebensjahr und für Atypische Karzinoide der Lunge im 59. Lebensjahr sowie für die Typischen Karzinoide im 49. Lebensjahr angegeben. Das SCLC tritt durchschnittlich in einem Alter von 65 Jahren auf, das NSCLC in einem Alter von 60 Jahren (Oronsky et al. 2017a).

Bei der Auswertung des **Geschlechts** stellten wir mit 51,1% einen prozentual etwas höheren Anteil männlicher Patienten im Vergleich zu den weiblichen Patienten fest, deren Anteil bei 44,3% lag. 13 Patienten, welche einem Anteil von 4,3% der Gesamtkohorte entsprachen, war kein Geschlecht zugeordnet worden. In einer retrospektiven Studie aus den USA wurden die Daten von über 64.000 NEN-Patienten aus den Jahren 1973 bis 2021 aus dem SEER-Register (Surveillance, Epidemiology, and End Results) epidemiologisch untersucht. Hierbei wurde mit 52,7% ein etwas höherer Anteil an weiblichen NEN-Betroffenen im Vergleich zu den männlichen mit 47,3% festgestellt (Dasari et al. 2017). Dagegen wurde in einer kürzlich in Österreich durchgeführten prospektiven Studie für GEP-NEN mit 2,51/100.000 eine etwas höhere Inzidenz bei den Männern als bei den Frauen mit einer Inzidenz von 2,36/100.000 berichtet, was sich, unter Berücksichtigung der Patienten ohne zugeordnetem Geschlecht, gut mit der Verteilung in unserer Untersuchung vergleichen lässt (www.net-register.org).

Beim **Gesamtüberleben** konnte in der vorliegenden Untersuchung auf die Daten von 85 Patienten zurückgegriffen werden, die im Beobachtungszeitraum verstorben waren. Hier zeigte sich eine große Spannweite mit einem Minimalwert von 0,1 Monaten und einem Maximum von 351 Monaten Überlebenszeit nach Erstdiagnose. Diese starke Variation erklärt sich unter anderem durch das Zusammenfassen aller NEN-Subtypen für die erste generelle Auswertung: Während als G1 eingestufte GEP-NEN ein langsames Wachstum mit einem eher benignen Verhalten zeigen, stellen beispielsweise SCLC sehr aggressive Tumore mit einem sehr hohen Mitoseindex und einer äußerst schlechten Prognose dar. Aber auch generell gibt es unter den neuroendokrinen Tumoren nachgewiesenermaßen eine starke Variation hinsichtlich ihrer Prognose (Dasari et al. 2017, Oronsky et al. 2017b).

Die durchschnittliche Beobachtungszeit, d.h. die Zeit zwischen der Diagnosestellung und dem Letztkontakt bei Erhebung der Daten der Patienten am 27.01.2016 lag insgesamt bei 58,5 Monaten. 85 aller NEN-Patienten waren im Beobachtungszeitraum verstorben. Die mittlere Überlebenszeit dieser Patienten lag bei 43,3 Monaten.

Laut Literaturangaben können 62-67 % der diagnostizierten NEN den **gastroenteropankreatischen NEN** zugeordnet werden, wohingegen 22-27% den

bronchopulmonalen NEN angehören (Oronsky et al. 2017a). In unserer Studie konnten ähnliche Verhältnisse zwischen den Subtypen aufgezeigt werden: Es flossen 172 GEP-NEN und 97 BP-NEN in die Auswertung ein, was einem Verhältnis von 62,8% GEP-NEN und 35,4% BP-NEN in der ausgewerteten NEN-Serie entspricht.

Über lange Zeit wurden neuroendokrine Neoplasien sehr uneinheitlich und mittels unterschiedlicher und teils wenig aussagekräftiger Klassifikationen eingeteilt.

Für die NENs hat sich zuletzt insbesondere die **Grading**-Klassifikation durchgesetzt, in welche nach der letzten Version der WHO von 2010 der Mitoseindex oder der Ki-67-Index einfließen. Die Grading-Einteilung reicht von G1 als gut differenziert mit guter Prognose, über G2 als mittelmäßig differenziert und mit schwer vorhersagbarer Prognose zu G3 als schlecht differenziert mit schlechter Prognose (Oronsky et al. 2017a).

Insgesamt konnten die Daten von 269 Tumoren in die statistische Auswertung des Gradings einfließen. Von diesen 269 NEN zeigten 40,1% eine G1-, 32,0% eine G2- und 27,9% eine G3-Histologie.

Bei der Auswertung der **TNM-Stadien** und des **Stagings** konnten nur 156 der neuroendokrinen Tumore berücksichtigt werden. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, dass die SCLC der vorliegenden Arbeit größtenteils nur nach der klinisch relevanten Klassifikation in very limited disease (VLD), limited disease (LD) und extensive disease (ED) eingeteilt wurden (Oronsky et al. 2017b).

Von den 156 NEN, zu denen Angaben zur TNM-Klassifikation vorlagen, befand sich bei Erstdiagnose circa je ein Viertel in einem T1- oder einem T2-Stadium, die mit 33,1% höchste Anzahl in einem T3- und die verbliebenen 13,7% Tumore in einem T4-Stadium. Weiterhin zeigten 59,4% der Tumore bereits ein N1-Stadium, für 56,4% wurde ein M1-Stadium diagnostiziert.

Für 12,2% dieser NEN ergab sich daraus ein S1-, für 7,7% ein S2- und für 14,7% ein S3-Stadium. Für 65,4% der NENs wurde ein S4-Stadium diagnostiziert.

Die nahezu gleichmäßige Aufteilung der Tumore in die verschiedenen G-Klassen sowie die hohe Anzahl an Tumoren in einem fortgeschrittenen Stadium mit bereits bei Diagnosestellung vorhandenen Lymphknoten- und/oder Fernmetastasen könnte dadurch zu erklären sein, dass circa 80% der neuroendokrinen Tumore keine Hormonproduktion aufweisen und somit wenige Symptome verursachen, also „stumme“ Tumore darstellen. Die Diagnose erfolgt daher in vielen Fällen als Zufallsbefund im Rahmen eines anderen bauchchirurgischen Eingriffs oder erst dann, wenn der Tumor durch sein Wachstum bereits zu lokalen Verdrängungserscheinungen geführt hat und sich folglich in einem späteren Stadium befindet. Auch hormonaktive neuroendokrine Tumore werden oft erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Die von ihnen verursachten Symptome sind vielfach unspezifisch und werden

in den meisten Fällen über einen langen Zeitraum fehlinterpretiert. Zudem gelten NEN mit einem prozentualen Anteil von unter 0,5% aller Tumorerkrankungen als Rarität und werden selten als eine der ersten Differenzialdiagnosen in Erwägung gezogen (Scherubl et al. 2019).

6.3.2. Somatostatin-4-Rezeptor-Expressionsprofil

Die Auswertung der **SST4-Expression** in den verschiedenen NEN-Entitäten ergab ein möglicherweise relevantes Auftreten des SST4 in den GEP-NEN des Pankreas und des Rektums sowie in den zu den BP-NEN gehörenden Typischen und Atypischen Karzinoiden. In diesen vier NEN-Subentitäten konnte ein medianer IRS-Mittelwert von größer gleich drei ermittelt werden.

Interessanterweise ließ sich jedoch in fast jeder NEN-Subentität eine große Variabilität hinsichtlich des SST4-Vorkommens beobachten. Sehr hohe Ausreißer konnten bei den GEP-NEN des Magens, des Duodenums/Jejunums, des Ileums und des Pankreas und bei den SCLC dokumentiert werden, sodass bei einem bestimmten Anteil der an diesen NEN erkrankten Patienten eine klinisch relevante Expression vorhanden sein könnte.

6.3.3. Zusammenhang zwischen der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression und den klinischen Daten

Für die gesamte Serie der im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierten neuroendokrinen Neoplasien konnte eine signifikante positive Korrelation insbesondere zwischen der SST4-Expression und der Expression des Dopamin-D2-Rezeptors, des SST1, des SST5, des Chemokinrezeptors CXCR4, des Proliferationsmarkers Ki-67, des Immuncheckpoint-Proteins PDL-1 und dem Marker für neuroendokrine Tumore Chromogranin A festgestellt werden.

Um aussagekräftigere Ergebnisse bezüglich dieser Korrelationen zu erhalten, wurden die GEP-NEN und BP-NEN anschließend getrennt voneinander statistisch untersucht.

6.3.3.1. Zusammenhang zwischen der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression und den klinischen Daten in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien

Bei alleiniger Betrachtung der GEP-NEN ergab sich ebenfalls eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Vorkommen des SST4 und dem Gesamtüberleben der verstorbenen Patienten. In Übereinstimmung hiermit fanden sich unter anderem wiederum signifikante positive Korrelationen zwischen der SST4-Expression und dem Auftreten der negativen prognostischen Marker Ki-67 und PDL-1 (Kim et al. 2016, Bosch et al. 2019, Mai et al. 2019). Weiterhin fand sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der SST4-Expression in den GEP-NEN und dem Tumor-Grading. Somit können Beobachtungen über

ein vermehrtes Vorkommen des SST4 in stärker entdifferenziertem Tumorgewebe zumindest für die GEP-NEN bestätigt werden (Herrera-Martinez et al. 2018). Ob der SST4 bei GEP-NEN auch als ein negativer Prognosemarker dienen könnte, bleibt vorerst abzuwarten.

Beim Vergleich der SST4-Expression zwischen den verschiedenen GEP-NEN-Primärtumorlokalisationen zeigten die Tumore aus dem Pankreas eine signifikant höhere SST4-Expression gegenüber den Neoplasien aus der Appendix oder dem Ileum. Die GEP-NENs aus dem Rektum wiesen hingegen lediglich eine höhere SST4-Expression als die Tumore aus dem Ileum auf.

Diese Befunde könnten die Grundlage für weitere Untersuchungen bilden, um herauszufinden, ob sich der SST4 als ein möglicher weiterer Marker bei der Suche nach einem unbekanntem Primärtumor bei einer GEP-NEN-Erkrankung im metastasierten Stadium eignen könnte.

6.3.3.2. Zusammenhang zwischen der Somatostatin-Rezeptor-4-Expression und den klinischen Daten in bronchopulmonalen neuroendokrinen Neoplasien

Deutlich andere Ergebnisse als bei den GEP-NEN konnten bei der statistischen Auswertung der BP-NEN verzeichnet werden. Hier zeigte sich eine signifikante negative **Korrelation** zwischen der SST4-Expression und dem Proliferationsmarker Ki-67. Auch konnte bei den BP-NEN im Log-Rank- und im Breslow-Test sowie in den Kaplan-Meier-Analysen ein verbessertes Überleben der BP-NEN-Patienten bei einer höheren SST4-Expression des Tumors festgestellt werden.

Diese Befunde entsprechen den Ergebnissen von mRNA-Analysen und immunhistochemischen Untersuchungen mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern in der Literatur, welche an großen Serien von neuroendokrinen Tumoren der Lunge durchgeführt worden waren, und zeigen konnten, dass das Ausmaß der SST4-Expression mit zunehmender Entdifferenzierung der Tumore abnimmt (Tsuta et al. 2012, Kaemmerer et al. 2015a).

Ein prognostischer Wert oder eine Bedeutung des SST4 für die Diagnostik oder Therapie von BP-NEN ist jedoch aufgrund seines insgesamt geringen Auftretens in dieser Tumorentität nicht zu erwarten.

7. Schlussfolgerungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe des neuen monoklonalen Kaninchenantikörpers 7H49L61 eine umfassende immunhistochemische Analyse über das Vorkommen des SST4 an einer großen Serie menschlicher normal gesunder und neoplastischer Gewebe vorzunehmen, wobei bei den zu untersuchenden Tumoren ein Schwerpunkt auf den neuroendokrinen Neoplasien lag, für welche eine Überexpression des SST2 und des SST5 bekannt ist. Dabei sollte ein umfangreicher Überblick über das Expressionsprofil dieses Rezeptors im gesunden menschlichen Körper und in Neoplasien gewonnen sowie die Spezifität des eingesetzten Antikörpers 7H49L61 bewertet werden.

Wie aus den bisherigen Literaturangaben zu erwarten gewesen war, unterschied sich das Vorkommen des SST4 sowohl in gesunden Geweben als auch in Tumoren deutlich von der Expressionscharakteristik der anderen SST-Subtypen.

So fand sich der SST4 in gesunden menschlichen Geweben in einer eher geringen bis maximal mäßigen Expressionsstärke, wobei er ein vorwiegend zytoplasmatisches und nur selten ein membranständiges Vorkommen zeigte.

Auch in den untersuchten humanen Neoplasien konnte ein vorwiegend zytoplasmatisches und nur in einigen wenigen Tumoren ein membranständiges Auftreten des SST4 verzeichnet werden. Die intensivste SST4-Expression wurde (in absteigender Reihenfolge) bei den Nebenschilddrüsenadenomen, den Magenkarzinomen, den Gliomen, den Phäochromozytomen und den Pankreaskarzinomen gefunden. In nahezu jeder SST4-exprimierenden Tumorentität konnte eine teils sehr hohe Variabilität zwischen den individuellen Präparaten bezüglich des Ausmaßes der SST4-Expression festgestellt werden. Zudem wurde oft ein intensiveres SST4-Auftreten an den Wachstumszonen der Tumore beobachtet, wohingegen das Tumorrinnere und die stärker entarteten Tumorareale eine geringere SST4-Expression bis hin zu einem Verschwinden des Rezeptors aufwiesen.

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die SST4-Expression eines Tumors von noch weitestgehend unbekanntem individuellen Faktoren und Zellsignalwegen abhängig ist und das Fortschreiten der Entartung in einigen Tumorentitäten mit einem Verlust der SST4-Expression einherzugehen scheint.

Insgesamt könnte der SST4 ein interessantes Target für eine Vielzahl von Erkrankungen und Tumorleiden darstellen.

Im Hinblick auf die neuroendokrinen Tumore scheint der SST4 eine sehr unterschiedliche Bedeutung für die verschiedenen Subentitäten aufzuweisen. Während er in den GEP-NEN mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben sowie mit einer vermehrten Expression negativer prognostischer Marker wie dem Ki-67, dem PDL-1 oder dem CXCR4 assoziiert war,

konnte er in den BP-NEN mit einem signifikant besseren Überleben und einem verminderten Ki-67-Index in Zusammenhang gebracht werden.

Aufgrund der statistisch signifikant unterschiedlichen Expressionsstärke des SST4 zwischen den GEP-NEN aus dem Pankreas und den Tumoren aus dem Ileum oder der Appendix sowie zwischen den GEP-NEN aus dem Rektum und den Neoplasien aus dem Ileum, könnte der SST4 zukünftig für die Lokalisationsdiagnostik bei unbekanntem Primärtumor als ein gutes Hilfsmittel in Betracht gezogen werden. Insgesamt war jedoch sowohl in den GEP-NEN als auch in den BP-NEN eine nur geringe SST4-Expression zu verzeichnen. Aus diesem Grund wird der SST4 wohl auch zukünftig in diesen Tumorentitäten kaum eine klinisch relevante Zielstruktur für diagnostische und therapeutische Ansätze darstellen.

Die zur Testung der Spezifität des neuen monoklonalen Antikörpers 7H49L61 durchgeführten Peptidneutralisationen erbrachten die erwarteten Ergebnisse. Auch fand sich für einen überwiegenden Anteil der analysierten Gewebe und Tumore einschließlich der gewählten Positivkontrollen eine gute Übereinstimmung zwischen den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit und den Ergebnissen bisheriger Studien, welche größtenteils auf Untersuchungen mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern und mRNA-Analysen basierten.

Schlussfolgernd kann die Spezifität des neuen monoklonalen Kaninchen-Anti-SST4-Antikörpers 7H49L61 als hoch eingeschätzt werden, so dass er für den Einsatz in immunhistochemischen Untersuchungen zur Expression des SST4 in humanen Geweben empfohlen werden kann.

Durch die vorliegende Arbeit konnte insgesamt ein weiterer wichtiger Beitrag zur Aufklärung der SST4-Expression in gesunden und neoplastischen menschlichen Geweben geleistet werden. Der dabei erstellte Überblick über die SST4-Expression im gesunden menschlichen Gewebe sowie in einer Vielzahl von menschlichen Tumorentitäten stellt eine gute Grundlage für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen klinischen Bedeutung dieses Rezeptors für verschiedene Erkrankungen und Tumorleiden dar. Für einige dieser Erkrankungen und Tumorleiden könnten sich so in Zukunft neue diagnostische und therapeutische Optionen ergeben.

8. Literaturverzeichnis

2012. Pasireotide. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. Bethesda (MD).
- Abbas O, Miller DD, Bhawan J. 2014. Cutaneous malignant melanoma: update on diagnostic and prognostic biomarkers. *Am J Dermatopathol*, 36 (5):363-379.
- Ain KB, Taylor KD, Tofiq S, Venkataraman G. 1997. Somatostatin receptor subtype expression in human thyroid and thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab*, 82 (6):1857-1862.
- Akkaya M, Kwak K, Pierce SK. 2020. B cell memory: building two walls of protection against pathogens. *Nat Rev Immunol*, 20 (4):229-238.
- Arne G, Nilsson B, Dalmo J, Kristiansson E, Arvidsson Y, Forssell-Aronsson E, Nilsson O, Ahlman H. 2013. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) express somatostatin receptors and bind radiolabeled somatostatin analogs. *Acta Oncol*, 52 (4):783-792.
- Baou N, Bouras M, Droz JP, Dutrieux-Berger N, Bouvier R, Benahmed M, Krantic S. 2001. Somatostatin receptor expression profile as a potential criterion for discrimination between seminoma and non-seminoma testicular tumors. *Cancer Detect Prev*, 25 (5):446-453.
- Bar KJ, Schurigt U, Scholze A, Segond Von Banchet G, Stopfel N, Brauer R, Halbhuber KJ, Schaible HG. 2004. The expression and localization of somatostatin receptors in dorsal root ganglion neurons of normal and monoarthritic rats. *Neuroscience*, 127 (1):197-206.
- Bhandari S, Watson N, Long E, Sharpe S, Zhong W, Xu SZ, Atkin SL. 2008. Expression of somatostatin and somatostatin receptor subtypes 1-5 in human normal and diseased kidney. *J Histochem Cytochem*, 56 (8):733-743.
- Blaker M, Schmitz M, Gocht A, Burghardt S, Schulz M, Broring DC, Pace A, Greten H, De Weerth A. 2004. Differential expression of somatostatin receptor subtypes in hepatocellular carcinomas. *J Hepatol*, 41 (1):112-118.
- Bosch F, Bruwer K, Altendorf-Hofmann A, Auernhammer CJ, Spitzweg C, Westphalen CB, Boeck S, Schubert-Fritschle G, Werner J, Heinemann V, Kirchner T, Angele M, Knosel T. 2019. Immune checkpoint markers in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasia. *Endocr Relat Cancer*, 26 (3):293-301.
- Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. 1992. Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (23):11151-11155.
- Caron P, Buscail L, Beckers A, Esteve JP, Igout A, Hennen G, Susini C. 1997. Expression of somatostatin receptor SST4 in human placenta and absence of octreotide effect on human placental growth hormone concentration during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 82 (11):3771-3776.
- Cervera P, Videau C, Viollet C, Petrucci C, Lacombe J, Winsky-Sommerer R, Csaba Z, Helboe L, Daumas-Duport C, Reubi JC, Epelbaum J. 2002. Comparison of somatostatin receptor expression in human gliomas and medulloblastomas. *J Neuroendocrinol*, 14 (6):458-471.
- Chalabi M, Duluc C, Caron P, Vezzosi D, Guillermet-Guibert J, Pyronnet S, Bousquet C. 2014. Somatostatin analogs: does pharmacology impact antitumor efficacy? *Trends Endocrinol Metab*, 25 (3):115-127.
- Colao A, Bronstein MD, Freda P, Gu F, Shen CC, Gadelha M, Fleseriu M, van der Lely AJ, Farrall AJ, Hermosillo Resendiz K, Ruffin M, Chen Y, Sheppard M, Pasireotide CSG. 2014. Pasireotide versus octreotide in acromegaly: a head-to-head superiority study. *J Clin Endocrinol Metab*, 99 (3):791-799.
- Cordelier P, Esteve JP, Najib S, Moroder L, Vaysse N, Pradayrol L, Susini C, Buscail L. 2006. Regulation of neuronal nitric-oxide synthase activity by somatostatin analogs following SST5 somatostatin receptor activation. *J Biol Chem*, 281 (28):19156-19171.
- Corness JD, Demchyshyn LL, Seeman P, Van Tol HH, Srikant CB, Kent G, Patel YC, Niznik HB. 1993. A human somatostatin receptor (SSTR3), located on chromosome 22,

- displays preferential affinity for somatostatin-14 like peptides. *FEBS Lett*, 321 (2-3):279-284.
- Corti A, Marcucci F, Bachetti T. 2018. Circulating chromogranin A and its fragments as diagnostic and prognostic disease markers. *Pflugers Arch*, 470 (1):199-210.
- Couvelard A, Pelaprat D, Dokmak S, Sauvanet A, Voisin T, Couvineau A, Ruszniewski P. 2017. Antisecretory Effects of Chimeric Somatostatin/Dopamine Receptor Ligands on Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Pancreas*, 46 (5):631-638.
- Cuevas-Ramos D, Fleseriu M. 2014. Somatostatin receptor ligands and resistance to treatment in pituitary adenomas. *J Mol Endocrinol*, 52 (3):R223-240.
- Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, Shih T, Yao JC. 2017. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol*, 3 (10):1335-1342.
- Devouassoux-Shisheboran M, Mauduit C, Tabone E, Droz JP, Benahmed M. 2003. Growth regulatory factors and signalling proteins in testicular germ cell tumours. *APMIS*, 111 (1):212-224; discussion 224.
- Drury LJ, Ziarek JJ, Gravel S, Veldkamp CT, Takekoshi T, Hwang ST, Heveker N, Volkman BF, Dwinell MB. 2011. Monomeric and dimeric CXCL12 inhibit metastasis through distinct CXCR4 interactions and signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (43):17655-17660.
- Dutour A, Kumar U, Panetta R, Ouafik L, Fina F, Sasi R, Patel YC. 1998. Expression of somatostatin receptor subtypes in human brain tumors. *Int J Cancer*, 76 (5):620-627.
- Ecker DM, Jones SD, Levine HL. 2015. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*, 7 (1):9-14.
- Edgren M, Westlin JE, Kalkner KM, Sundin A, Nilsson S. 1999. [¹¹¹In-DPTA-D-Phe¹]-octreotide scintigraphy in the management of patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm*, 14 (1):59-64.
- Eibel H, Kraus H, Sic H, Kienzler AK, Rizzi M. 2014. B cell biology: an overview. *Curr Allergy Asthma Rep*, 14 (5):434.
- Fani M, Nicolas GP, Wild D. 2017. Somatostatin Receptor Antagonists for Imaging and Therapy. *J Nucl Med*, 58 (Suppl 2):61S-66S.
- Farrag M, Ibrahim E, Abdelwahab H, Elsergany A, Elhadidy T. 2021. PDL-1 expression in lung carcinoma and its correlation with clinicopathological and prognostic characteristics. *J Immunoassay Immunochem*:1-12.
- Fehlmann D, Langenegger D, Schuepbach E, Siehler S, Feuerbach D, Hoyer D. 2000. Distribution and characterisation of somatostatin receptor mRNA and binding sites in the brain and periphery. *J Physiol Paris*, 94 (3-4):265-281.
- Ferone D, Pivonello R, Kwekkeboom DJ, Gatto F, Ameri P, Colao A, de Krijger RR, Minuto F, Lamberts SW, van Hagen PM, Hofland LJ. 2012. Immunohistochemical localization and quantitative expression of somatostatin receptors in normal human spleen and thymus: Implications for the in vivo visualization during somatostatin receptor scintigraphy. *J Endocrinol Invest*, 35 (5):528-534.
- 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.
- Fortune BE, Jackson J, Leonard J, Trotter JF. 2009. Vapreotide: a somatostatin analog for the treatment of acute variceal bleeding. *Expert Opin Pharmacother*, 10 (14):2337-2342.
- Fрати A, Rouzier R, Lesieur B, Werkoff G, Antoine M, Rodenas A, Darai E, Chereau E. 2014. Expression of somatostatin type-2 and -4 receptor and correlation with histological type in breast cancer. *Anticancer Res*, 34 (8):3997-4003.
- Freudenberg LS, Gauler T, Gorges R, Bauer S, Stergar H, Antoch G, Bockisch A, Schutte J. 2008. Somatostatin receptor scintigraphy in advanced renal cell carcinoma. Results of a phase II-trial of somatostatin analogue therapy in patients with advanced RCC. *Nuklearmedizin*, 47 (3):127-131.

- Gatto F, Hofland LJ. 2011. The role of somatostatin and dopamine D2 receptors in endocrine tumors. *Endocr Relat Cancer*, 18 (6):R233-251.
- Giovanella L, Treglia G, Iakovou I, Mihailovic J, Verburg FA, Luster M. 2020. EANM practice guideline for PET/CT imaging in medullary thyroid carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 47 (1):61-77.
- Gunther T, Tulipano G, Dournaud P, Bousquet C, Csaba Z, Kreienkamp HJ, Lupp A, Korbonits M, Castano JP, Wester HJ, Culler M, Melmed S, Schulz S. 2018. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature. *Pharmacol Rev*, 70 (4):763-835.
- Hanack K, Messerschmidt K, Listek M. 2016. Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies. *Adv Exp Med Biol*, 917:11-22.
- Hansson J, Bjartell A, Gadaleanu V, Dizeyi N, Abrahamsson PA. 2002. Expression of somatostatin receptor subtypes 2 and 4 in human benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. *Prostate*, 53 (1):50-59.
- Harda K, Szabo Z, Juhasz E, Dezso B, Kiss C, Schally AV, Halmos G. 2020. Expression of Somatostatin Receptor Subtypes (SSTR-1-SSTR-5) in Pediatric Hematological and Oncological Disorders. *Molecules*, 25 (23).
- Helyes Z, Pinter E, Sandor K, Elekes K, Banvolgyi A, Keszthelyi D, Szoke E, Toth DM, Sandor Z, Kereskai L, Pozsgai G, Allen JP, Emson PC, Markovics A, Szolcsanyi J. 2009. Impaired defense mechanism against inflammation, hyperalgesia, and airway hyperreactivity in somatostatin 4 receptor gene-deleted mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (31):13088-13093.
- Herac M, Niederle B, Raderer M, Krebs M, Kaserer K, Koperek O. 2016. Expression of somatostatin receptor 2A in medullary thyroid carcinoma is associated with lymph node metastasis. *APMIS*, 124 (10):839-845.
- Herrera-Martinez AD, Gahete MD, Pedraza-Arevalo S, Sanchez-Sanchez R, Ortega-Salas R, Serrano-Blanch R, Luque RM, Galvez-Moreno MA, Castano JP. 2018. Clinical and functional implication of the components of somatostatin system in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrine*, 59 (2):426-437.
- Heston TF, Wahl RL. 2010. Molecular imaging in thyroid cancer. *Cancer Imaging*, 10:1-7.
- Heute D, Kostron H, von Guggenberg E, Ingorokva S, Gabriel M, Dobrozemsky G, Stockhammer G, Virgolini IJ. 2010. Response of recurrent high-grade glioma to treatment with (90)Y-DOTATOC. *J Nucl Med*, 51 (3):397-400.
- Hofland J, Zandee WT, de Herder WW. 2018. Role of biomarker tests for diagnosis of neuroendocrine tumours. *Nat Rev Endocrinol*, 14 (11):656-669.
- Hoog A, Kjellman M, Mattsson P, Juhlin CC, Shabo I. 2018. Somatostatin Receptor Expression in Renal Cell Carcinoma-A New Front in the Diagnostics and Treatment of Renal Cell Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*, 16 (3):e517-e520.
- Hutloff A. 2016. [T and B cell immune reactions in inflamed tissue]. *Z Rheumatol*, 75 (9):899-902.
- Isakov N. 2018. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Semin Cancer Biol*, 48:36-52.
- Kaemmerer D, Lupp A, Peter L, Fischer E, Schulz S, Kloppel G, Hommann M. 2013. Correlation of monoclonal and polyclonal somatostatin receptor 5 antibodies in pancreatic neuroendocrine tumors. *Int J Clin Exp Pathol*, 6 (1):49-54.
- Kaemmerer D, Specht E, Sanger J, Wirtz RM, Sayeg M, Schulz S, Lupp A. 2015a. Somatostatin receptors in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms: new diagnostic, prognostic, and therapeutic markers. *J Clin Endocrinol Metab*, 100 (3):831-840.
- Kaemmerer D, Trager T, Hoffmeister M, Sipos B, Hommann M, Sanger J, Schulz S, Lupp A. 2015b. Inverse expression of somatostatin and CXCR4 chemokine receptors in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms of different malignancy. *Oncotarget*, 6 (29):27566-27579.
- Kaemmerer D, Schindler R, Mussbach F, Dahmen U, Altendorf-Hofmann A, Dirsch O, Sanger J, Schulz S, Lupp A. 2017a. Somatostatin and CXCR4 chemokine receptor

- expression in hepatocellular and cholangiocellular carcinomas: tumor capillaries as promising targets. *BMC Cancer*, 17 (1):896.
- Kaemmerer D, Sanger J, Arsenic R, D'Haese JG, Neumann J, Schmitt-Graeff A, Wirtz RM, Schulz S, Lupp A. 2017b. Evaluation of somatostatin, CXCR4 chemokine and endothelin A receptor expression in a large set of paragangliomas. *Oncotarget*, 8 (52):89958-89969.
- Kajtazi Y, Kaemmerer D, Sanger J, Schulz S, Lupp A. 2019. Somatostatin and chemokine CXCR4 receptor expression in pancreatic adenocarcinoma relative to pancreatic neuroendocrine tumours. *J Cancer Res Clin Oncol*, 145 (10):2481-2493.
- Kamradt T, Ferrari-Kuhne K. 2011. [Adaptive immunity]. *Dtsch Med Wochenschr*, 136 (33):1678-1683.
- Karavitakis M, Msaouel P, Michalopoulos V, Koutsilieris M. 2014. Pattern of somatostatin receptors expression in normal and bladder cancer tissue samples. *Anticancer Res*, 34 (6):2937-2942.
- Kecskes A, Pohoczky K, Kecskes M, Varga ZV, Kormos V, Szoke E, Henn-Mike N, Feher M, Kun J, Gyenesei A, Renner E, Palkovits M, Ferdinandy P, Abraham IM, Gaszner B, Helyes Z. 2020. Characterization of Neurons Expressing the Novel Analgesic Drug Target Somatostatin Receptor 4 in Mouse and Human Brains. *Int J Mol Sci*, 21 (20).
- Kendler DB, Araujo ML, Jr., Alencar R, de Souza Accioly MT, Bulzico DA, de Noronha Pessoa CC, Accioly FA, de Farias TP, Lopes F, Corbo R, Vaisman M, Vaisman F. 2017. Somatostatin receptor subtype 1 might be a predictor of better response to therapy in medullary thyroid carcinoma. *Endocrine*, 58 (3):474-480.
- Kim DW, Talati C, Kim R. 2017. Hepatocellular carcinoma (HCC): beyond sorafenib-chemotherapy. *J Gastrointest Oncol*, 8 (2):256-265.
- Kim ST, Ha SY, Lee S, Ahn S, Lee J, Park SH, Park JO, Lim HY, Kang WK, Kim KM, Park YS. 2016. The Impact of PD-L1 Expression in Patients with Metastatic GEP-NETs. *J Cancer*, 7 (5):484-489.
- Kiviniemi A, Gardberg M, Kivinen K, Posti JP, Vuorinen V, Sipila J, Rahi M, Sankinen M, Minn H. 2017. Somatostatin receptor 2A in gliomas: Association with oligodendrogliomas and favourable outcome. *Oncotarget*, 8 (30):49123-49132.
- Klagge A, Krause K, Schierle K, Steinert F, Dralle H, Fuhrer D. 2010. Somatostatin receptor subtype expression in human thyroid tumours. *Horm Metab Res*, 42 (4):237-240.
- Kloppel G, La Rosa S. 2018. Ki67 labeling index: assessment and prognostic role in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Virchows Arch*, 472 (3):341-349.
- Koch L. 2011. Pharmacotherapy: Somatoprim versus octreotide in acromegaly. *Nat Rev Endocrinol*, 8 (2):66.
- Kumar U, Grigorakis SI, Watt HL, Sasi R, Snell L, Watson P, Chaudhari S. 2005. Somatostatin receptors in primary human breast cancer: quantitative analysis of mRNA for subtypes 1--5 and correlation with receptor protein expression and tumor pathology. *Breast Cancer Res Treat*, 92 (2):175-186.
- Lamberts SWJ, Hofland LJ. 2019. ANNIVERSARY REVIEW: Octreotide, 40 years later. *Eur J Endocrinol*, 181 (5):R173-R183.
- Lange F, Kaemmerer D, Behnke-Mursch J, Bruck W, Schulz S, Lupp A. 2018. Differential somatostatin, CXCR4 chemokine and endothelin A receptor expression in WHO grade I-IV astrocytic brain tumors. *J Cancer Res Clin Oncol*, 144 (7):1227-1237.
- Lanneau C, Bluet-Pajot MT, Zizzari P, Csaba Z, Dournaud P, Helboe L, Hoyer D, Pellegrini E, Tannenbaum GS, Epelbaum J, Gardette R. 2000. Involvement of the Sst1 somatostatin receptor subtype in the intrahypothalamic neuronal network regulating growth hormone secretion: an in vitro and in vivo antisense study. *Endocrinology*, 141 (3):967-979.
- Lichtenauer-Kaligis EG, van Hagen PM, Lamberts SW, Hofland LJ. 2000. Somatostatin receptor subtypes in human immune cells. *Eur J Endocrinol*, 143 Suppl 1:S21-25.
- Lindstrom M, Tohmola N, Renkonen R, Hamalainen E, Schalin-Jantti C, Itkonen O. 2018. Comparison of serum serotonin and serum 5-HIAA LC-MS/MS assays in the diagnosis of serotonin producing neuroendocrine neoplasms: A pilot study. *Clin Chim Acta*, 482:78-83.

- Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, Weis-Garcia F. 2005. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *ILAR J*, 46 (3):258-268.
- Ludvigsen E, Carlsson C, Tiensuu Janson E, Sandler S, Stridsberg M. 2015. Somatostatin receptor 1-5; expression profiles during rat development. *Ups J Med Sci*, 120 (3):157-168.
- Lupp A, Nagel F, Schulz S. 2013. Reevaluation of sst(1) somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-7. *Regul Pept*, 183:1-6.
- Ma H, O'Kennedy R. 2015. The Structure of Natural and Recombinant Antibodies. *Methods Mol Biol*, 1348:7-11.
- Ma ZY, Gong YF, Zhuang HK, Zhou ZX, Huang SZ, Zou YP, Huang BW, Sun ZH, Zhang CZ, Tang YQ, Hou BH. 2020. Pancreatic neuroendocrine tumors: A review of serum biomarkers, staging, and management. *World J Gastroenterol*, 26 (19):2305-2322.
- Maas M, Mayer L, Hennenlotter J, Stuhler V, Walz S, Scharpf M, Kuhs U, Neumann T, Stenzl A, Todenhofer T. 2020. Prognostic impact of somatostatin receptor expression in advanced bladder cancer. *Urol Oncol*, 38 (12):935 e917-935 e928.
- Mai R, Kaemmerer D, Trager T, Neubauer E, Sanger J, Baum RP, Schulz S, Lupp A. 2019. Different somatostatin and CXCR4 chemokine receptor expression in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms depending on their origin. *Sci Rep*, 9 (1):4339.
- Mazzucchelli R, Morichetti D, Scarpelli M, Bono AV, Lopez-Beltran A, Cheng L, Kirkali Z, Montironi R. 2011. Somatostatin receptor subtypes in hormone-refractory (castration-resistant) prostatic carcinoma. *Asian J Androl*, 13 (2):242-247.
- Molinaro E, Romei C, Biagini A, Sabini E, Agate L, Mazzeo S, Materazzi G, Sellari-Franceschini S, Ribechini A, Torregrossa L, Basolo F, Vitti P, Elisei R. 2017. Anaplastic thyroid carcinoma: from clinicopathology to genetics and advanced therapies. *Nat Rev Endocrinol*, 13 (11):644-660.
- Montironi R, Cheng L, Mazzucchelli R, Morichetti D, Stramazzotti D, Santinelli A, Moroncini G, Galosi AB, Muzzonigro G, Comeri G, Lovisolo J, Cosciani-Cunico S, Bono AV. 2008. Immunohistochemical detection and localization of somatostatin receptor subtypes in prostate tissue from patients with bladder outlet obstruction. *Cell Oncol*, 30 (6):473-482.
- Mundschenk J, Unger N, Schulz S, Holt 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.
- Mussig K, Wehrmann T, Dittmann H, Wehrmann M, Ueberberg B, Schulz S, Bares R, Petersenn S. 2012. Expression of the proliferation marker Ki-67 associates with tumour staging and clinical outcome in differentiated thyroid carcinomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 77 (1):139-145.
- Nakayama Y, Wada R, Yajima N, Hakamada K, Yagihashi S. 2010. Profiling of somatostatin receptor subtype expression by quantitative PCR and correlation with clinicopathological features in pancreatic endocrine tumors. *Pancreas*, 39 (8):1147-1154.
- Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K, Murray PG. 2000. Monoclonal antibodies. *Mol Pathol*, 53 (3):111-117.
- O'Carroll AM. 2003. Localization of messenger ribonucleic acids for somatostatin receptor subtypes (sstr1-5) in the rat adrenal gland. *J Histochem Cytochem*, 51 (1):55-60.
- Oronsky B, Ma PC, Morgensztern D, Carter CA. 2017a. Nothing But NET: A Review of Neuroendocrine Tumors and Carcinomas. *Neoplasia*, 19 (12):991-1002.
- Oronsky B, Reid TR, Oronsky A, Carter CA. 2017b. What's New in SCLC? A Review. *Neoplasia*, 19 (10):842-847.
- Pallai P, Struthers S, Goodman M, Rivier J, Vale W. 1983. Extended retro-inverso analogs of somatostatin. *Biopolymers*, 22 (12):2523-2538.

- Panetta R, Patel YC. 1995. Expression of mRNA for all five human somatostatin receptors (hSSTR1-5) in pituitary tumors. *Life Sci*, 56 (5):333-342.
- Papotti M, Kumar U, Volante M, Pecchioni C, Patel YC. 2001. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor types 1-5 in medullary carcinoma of the thyroid. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 54 (5):641-649.
- Patel YC. 1999. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*, 20 (3):157-198.
- Pawlikowski M, Pisarek H, Kunert-Radek J, Radek A. 2003. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor subtypes in "clinically nonfunctioning" pituitary adenomas. *Endocr Pathol*, 14 (3):231-238.
- Pazaitou-Panayiotou K, Tiensuu Janson E, Koletsa T, Kotoula V, Stridsberg M, Karkavelas G, Karayannopoulou G. 2012. Somatostatin receptor expression in non-medullary thyroid carcinomas. *Hormones (Athens)*, 11 (3):290-296.
- Picard LP, Schonegge AM, Bouvier M. 2019. Structural Insight into G Protein-Coupled Receptor Signaling Efficacy and Bias between Gs and beta-Arrestin. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2 (3):148-154.
- Pivonello C, De Martino MC, Negri M, Cuomo G, Cariati F, Izzo F, Colao A, Pivonello R. 2014. The GH-IGF-SST system in hepatocellular carcinoma: biological and molecular pathogenetic mechanisms and therapeutic targets. *Infect Agent Cancer*, 9:27.
- Plockinger U, Hoffmann U, Geese M, Lupp A, Buchfelder M, Flitsch J, Vajkoczy P, Jakob W, Saeger W, Schulz S, Dohrmann C. 2012. DG3173 (somatoprim), a unique somatostatin receptor subtypes 2-, 4- and 5-selective analogue, effectively reduces GH secretion in human GH-secreting pituitary adenomas even in Octreotide non-responsive tumours. *Eur J Endocrinol*, 166 (2):223-234.
- Pola S, Cattaneo MG, Vicentini LM. 2003. Anti-migratory and anti-invasive effect of somatostatin in human neuroblastoma cells: involvement of Rac and MAP kinase activity. *J Biol Chem*, 278 (42):40601-40606.
- Portela-Gomes GM, Stridsberg M, Grimelius L, Oberg K, Janson ET. 2000. Expression of the five different somatostatin receptor subtypes in endocrine cells of the pancreas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 8 (2):126-132.
- Qiu C, Zeyda T, Johnson B, Hochgeschwender U, de Lecea L, Tallent MK. 2008. Somatostatin receptor subtype 4 couples to the M-current to regulate seizures. *J Neurosci*, 28 (14):3567-3576.
- Rai U, Thrimawithana TR, Valery C, Young SA. 2015. Therapeutic uses of somatostatin and its analogues: Current view and potential applications. *Pharmacol Ther*, 152:98-110.
- Ramirez RA, Chauhan A, Gimenez J, Thomas KEH, Kokodis I, Voros BA. 2017. Management of pulmonary neuroendocrine tumors. *Rev Endocr Metab Disord*, 18 (4):433-442.
- Remmele W, Stegner HE. 1987. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 8 (3):138-140.
- 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.
- Reynaert H, Rombouts K, Vandermonde A, Urbain D, Kumar U, Bioulac-Sage P, Pinzani M, Rosenbaum J, Geerts A. 2004. Expression of somatostatin receptors in normal and cirrhotic human liver and in hepatocellular carcinoma. *Gut*, 53 (8):1180-1189.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. 2009. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459 (7245):356-363.
- Rosner E, Kaemmerer D, Neubauer E, Sanger J, Lupp A. 2021. Prognostic value of PD-L1 expression in bronchopulmonary neuroendocrine tumours. *Endocr Connect*, 10 (2):180-190.
- Rovati GE, Capra V, Neubig RR. 2007. The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol*, 71 (4):959-964.
- Ruuska T, Ramirez Escalante Y, Vaitinen S, Gardberg M, Kiviniemi A, Marjamaki P, Kempainen J, Jyrkkio S, Minn H. 2018. Somatostatin receptor expression in

- lymphomas: a source of false diagnosis of neuroendocrine tumor at (68)Ga-DOTANOC PET/CT imaging. *Acta Oncol*, 57 (2):283-289.
- Sansone A, Lauretta R, Vottari S, Chiefari A, Barnabei A, Romanelli F, Appetecchia M. 2019. Specific and Non-Specific Biomarkers in Neuroendocrine Gastroenteropancreatic Tumors. *Cancers (Basel)*, 11 (8).
- Sarrouilhe D, Clarhaut J, Defamie N, Mesnil M. 2015. Serotonin and cancer: what is the link? *Curr Mol Med*, 15 (1):62-77.
- Sawicka-Gutaj N, Owecki M, Ruchala M. 2018. Pasireotide - Mechanism of Action and Clinical Applications. *Curr Drug Metab*, 19 (10):876-882.
- Scarpignato C, Pelosini I. 2001. Somatostatin analogs for cancer treatment and diagnosis: an overview. *Chemotherapy*, 47 Suppl 2:1-29.
- Scherubl H, Raue F, Frank-Raue K. 2019. [Neuroendocrine tumors : Classification, clinical presentation and imaging]. *Radiologe*, 59 (11):952-960.
- Schonbrunn A, Tashjian H, Jr. 1978. Characterization of functional receptors for somatostatin in rat pituitary cells in culture. *J Biol Chem*, 253 (18):6473-6483.
- Schulz S, Schmitt J, Weise W. 2003. Frequent expression of immunoreactive somatostatin receptors in cervical and endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 89 (3):385-390.
- Schulz S, Schmitt J, Quednow C, Roessner A, Weise W. 2002. Immunohistochemical detection of somatostatin receptors in human ovarian tumors. *Gynecol Oncol*, 84 (2):235-240.
- Selmer IS, Schindler M, Humphrey PP, Waldvogel HJ, Faull RL, Emson PC. 2000. First localisation of somatostatin sst(4) receptor protein in selected human brain areas: an immunohistochemical study. *Brain Res Mol Brain Res*, 82 (1-2):114-125.
- Shepard HM, Phillips GL, C DT, Feldmann M. 2017. Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. *Clin Med (Lond)*, 17 (3):220-232.
- Smith WH, Nair RU, Adamson D, Kearney MT, Ball SG, Balmforth AJ. 2005. Somatostatin receptor subtype expression in the human heart: differential expression by myocytes and fibroblasts. *J Endocrinol*, 187 (3):379-386.
- Solarski M, Williams D, Mehrabian M, Wang H, Wille H, Schmitt-Ulms G. 2019. The human brain somatostatin interactome: SST binds selectively to P-type family ATPases. *PLoS One*, 14 (5):e0217392.
- Specht E, Kaemmerer 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*, 67 (3):368-377.
- Srikant CB, Murthy KK, Escher EE, Patel YC. 1992. Photoaffinity labeling of the somatostatin receptor: identification of molecular subtypes. *Endocrinology*, 130 (5):2937-2946.
- Stollberg S, Kaemmerer D, Neubauer E, Schulz S, Simonitsch-Klupp I, Kiesewetter B, Raderer M, Lupp A. 2017. Erratum to: Differential somatostatin and CXCR4 chemokine receptor expression in MALT-type lymphoma of gastric and extragastric origin. *J Cancer Res Clin Oncol*, 143 (1):187.
- Storvall S, Leijon H, Ryhanen E, Louhimo J, Haglund C, Schalin-Jantti C, Arola J. 2019. Somatostatin receptor expression in parathyroid neoplasms. *Endocr Connect*, 8 (8):1213-1223.
- Stumpf C, Kaemmerer D, Neubauer E, Sanger J, Schulz S, Lupp A. 2018. Somatostatin and CXCR4 expression patterns in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung relative to small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 144 (10):1921-1932.
- Sun L, Coy DH. 2016. Somatostatin and its Analogs. *Curr Drug Targets*, 17 (5):529-537.
- Suteau V, Collin A, Menei P, Rodien P, Rousselet MC, Briet C. 2020. Expression of programmed death-ligand 1 (PD-L1) in human pituitary neuroendocrine tumor. *Cancer Immunol Immunother*, 69 (10):2053-2061.
- 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.
- Theodoropoulou M, Stalla GK. 2013. Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol*, 34 (3):228-252.

- Traub-Weidinger T, Putzer D, von Guggenberg E, Dobrozemsky G, Nilica B, Kendler D, Bale R, Virgolini IJ. 2015. Multiparametric PET imaging in thyroid malignancy characterizing tumour heterogeneity: somatostatin receptors and glucose metabolism. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 42 (13):1995-2001.
- Tsuta K, Wistuba II, Moran CA. 2012. Differential expression of somatostatin receptors 1-5 in neuroendocrine carcinoma of the lung. *Pathol Res Pract*, 208 (8):470-474.
- Ueberberg B, Tourne H, Redmann A, Walz MK, Schmid KW, Mann K, Petersenn S. 2005. Differential expression of the human somatostatin receptor subtypes sst1 to sst5 in various adrenal tumors and normal adrenal gland. *Horm Metab Res*, 37 (12):722-728.
- Unger N, Ueberberg B, Schulz S, Saeger W, Mann K, Petersenn S. 2012. Differential expression of somatostatin receptor subtype 1-5 proteins in numerous human normal tissues. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 120 (8):482-489.
- Verhoef C, van Dekken H, Hofland LJ, Zondervan PE, de Wilt JH, van Marion R, de Man RA, JN IJ, van Eijck CH. 2008. Somatostatin receptor in human hepatocellular carcinomas: biological, patient and tumor characteristics. *Dig Surg*, 25 (1):21-26.
- Vikic-Topic S, Raisch KP, Kvols LK, Vuk-Pavlovic S. 1995. Expression of somatostatin receptor subtypes in breast carcinoma, carcinoid tumor, and renal cell carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 80 (10):2974-2979.
- Vitale G, Dicitore A, Sciammarella C, Di Molfetta S, Rubino M, Faggiano A, Colao A. 2018. Pasireotide in the treatment of neuroendocrine tumors: a review of the literature. *Endocr Relat Cancer*, 25 (6):R351-R364.
- Vogel A, Saborowski A. 2017. Cholangiocellular Carcinoma. *Digestion*, 95 (3):181-185.
- Wang YH, Yang QC, Lin Y, Xue L, Chen MH, Chen J. 2014. Chromogranin A as a marker for diagnosis, treatment, and survival in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasm. *Medicine (Baltimore)*, 93 (27):e247.
- Weis WI, Kobilka BK. 2018. The Molecular Basis of G Protein-Coupled Receptor Activation. *Annu Rev Biochem*, 87:897-919.
- Weller M, Wick W, Aldape K, Brada M, Berger M, Pfister SM, Nishikawa R, Rosenthal M, Wen PY, Stupp R, Reifenberger G. 2015. Glioma. *Nat Rev Dis Primers*, 1:15017.
- Werner C, Dirsch O, Dahmen U, Grimm MO, Schulz S, Lupp A. 2020. Evaluation of Somatostatin and CXCR4 Receptor Expression in a Large Set of Prostate Cancer Samples Using Tissue Microarrays and Well-Characterized Monoclonal Antibodies. *Transl Oncol*, 13 (9):100801.
- Wootla B, Denic A, Rodriguez M. 2014. Polyclonal and monoclonal antibodies in clinic. *Methods Mol Biol*, 1060:79-110.
- Xie YM, Li X, Yan LN, Wei B, Wang CH, Tang CW. 2015. [The Expressions of Somatostatin and Cyclooxygenase-2 in Chronic Hepatitis, Hepatic Cirrhosis, Precancerous Lesion and Hepatocellular Carcinoma]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 46 (5):710-716.
- Zeyda T, Hochgeschwender U. 2008. Null mutant mouse models of somatostatin and cortistatin, and their receptors. *Mol Cell Endocrinol*, 286 (1-2):18-25.
- Zhang C. 2012. Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies. *Methods Mol Biol*, 901:117-135.
- Zou Y, Tan H, Zhao Y, Zhou Y, Cao L. 2019. Expression and selective activation of somatostatin receptor subtypes induces cell cycle arrest in cancer cells. *Oncol Lett*, 17 (2):1723-1731.

<https://www.net-register.org/ne-tumore-allgemeine-informationen/>

9. Anhang

9.1. 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 und mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau apl. Prof. Dr. med. habil. A. Lupp. Ich erkläre zudem, dass 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.

Heidelberg, den 08.07.2021

Blanca Ehms

9.2. Danksagung

Mein erster und größter Dank gilt selbstverständlich Frau apl. Prof. Dr. med. Amelie Lupp für die jederzeit fürsorgliche, verständnisvolle und herzliche Betreuung und Unterstützung während der Arbeit.

Auch den Mitarbeiter*Innen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena möchte ich meinen Dank für die freundliche Arbeitsatmosphäre im Haus aussprechen.

Bedanken möchte ich mich zudem bei meinen Eltern und Großeltern, welche mich im Studium sowie in der Zeit der Dissertation auf allen Ebenen unterstützt und gefördert haben. Vielen Dank auch an meinen Partner Kieren sowie an meine kleine Schwester Patricia, die sich regelmäßig nach Fortschritten und neuen Entdeckungen erkundigten und mir geduldig zuhörten.

Vielen herzlichen Dank!

Heidelberg, den 08.07.2021

Blanca Ehms