# Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie Interdisziplinäres Stoffwechsel-Centrum der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

# **DISSERTATION**

# AKROMEGALIE: Selektiver Verlust des Somatostatin-Rezeptor-Subtyp 2 in Octreotid-resistenten Wachstumshormon-sezernierenden Hypophysenadenomen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Albrecht, Susann aus Marienberg - Rübenau

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. U. Plöckinger

2. Priv.-Doz. Dr. J. Schopohl

3. Prof. Dr. med. D. Klingmüller

Datum der Promotion: 19.09.2008

PD Dr. med. Ursula Plöckinger Betreuer:

Leitende Oberärztin

Interdisziplinäres Stoffwechsel-Centrum Endokrinologie, Diabetes mellitus und Stoffwechsel Charité – Universitätsmedizin Berlin

Campus Virchow Klinikum Augustenburger Platz 1 13353 Berlin

Tel.: 030 / 450-553 814

Inhaltsverzeichnis		
1.	Einleitung	6
1.1.	Epidemiologie	6
1.2.	klinisches Bild	7
1.3.	Physiologie und grundlegende Diagnostik	7
1.4.	Therapieziele	8
1.5	Therapieformen	9
1.5.1.	operativ	9
1.5.2.	•	11
	1. GH und Somatostatin	11
	2. Somatostatinrezeptoren	11
	3. Somatostatinanaloga	13
1.5.3.	<del>_</del>	15
	1. postoperative Therapie	15
1.6.	Fragestellung der Arbeit	16
2.	Methodik	18
2.1.	Diagnostische und therapeutische Definitionen	18
2.2.	Patientengut	19
2.2.1.		19
2.2.2.	I I	20
2.2.3.		20
2.3.	Laborwerte der Patienten	20
2.3.1.		21
2.3.2.		21
2.4.	Diagnose der Akromegalie	22
2.5.	Zeiträume der Untersuchungen	22
2.6.	experimenteller Teil	23
2.6.1.	Assays für die Diagnostik	23
2.6.2.	Herstellung der Paraffinblöcke	24
2.6.3.	AK-Gewinnung und Affinitätsreinigung	24
	Affinitätschromatographie	25
0.0.4	Immunzytochemie	26
2.6.4.	Western Blot Analyse	27
	Proteinbestimmung	27
	Isolierung der Glykoproteine mittels WGA	28
	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	28
	Übertragung der Proteine auf Nitrozellulosemembranen	29
0.05	Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe	30
2.6.5.	Immunhistochemische Bestimmung von	04
0.00	Somatostatin-Rezeptor-Subtypen	31
2.6.6. 2.7.	Kontrollen der Immunhistochemie Statistik	34 35
C.1.	STATISTIK	კე

3. 3.1. 3.2. 3.3. 3.4. 3.5. 3.5.1. 3.5.2.	Ergebnisse GH-Suppression Tumorvolumereduktion IGF-1-Werte Charakterisierung der Somatostatin-Rezeptor-Antikörper Somatostatin-Rezeptor-Subtypen-Verteilung GH-Response Tumorvolumen (TV)-Reduktion	37 39 41 41 46 47 52
4.	Diskussion	56
5.	Zusammenfassung	70
6.	Anhang	72
7.	Abkürzungsverzeichnis	76
8.	Literaturverzeichnis	79
	Danksagung	86
	Erklärung an Eides statt	87
	Lebenslauf	88

# 1. Einleitung

## 1.1. Epidemiologie

Akromegalie bezeichnet eine Größenzunahme der Akren nach Abschluß des Wachstumsalters infolge vermehrter autonomer Sekretion des Wachstumshormons (Growth Hormone, GH) durch ein Adenom des Hypophysenvorderlappen (HVL). Diese GH-sezernierenden Adenome machen rund 20% aller Hypophysentumore aus und sind in mehr als 90% der Fälle die Ursache für die Akromegalie (1).

Mit einer Inzidenz von 3-4 Patienten / 1 Million (Mio.) Einwohner (EW) / Jahr und einer Prävalenz von 40-70 Patienten / 1 Mio. EW ist die Akromegalie eine seltene Erkrankung, wobei Männer und Frauen gleichermaßen betroffen sind (2,3).

Die Bezeichnung "Akromegalie" geht auf den Franzosen Pierre Marie zurück, welcher 1886 zwei eigene Patienten mit diesem Krankheitsbild beschrieb. Bereits ein Jahr später vermutete man einen Zusammenhang zwischen der vergrößerten Hypophyse und dem Krankheitsbild der Akromegalie (4).

Unbehandelt - oder zu spät behandelt - führt diese Erkrankung zu hoher Co-Morbidität, verkürzt das Leben signifikant und weist eine 2-4 fach erhöhte Mortalität gegenüber der Normalbevölkerung auf (1-3,5).

Die Einschränkung der Lebenserwartung erfolgt bei 51,1% der Patienten durch kardiovaskuläre, bei 13% durch pulmonale Faktoren und bei 15% infolge maligner Neoplasien (5,6). Jüngste Studien zeigten, dass Akromegaliepatienten eine erhöhte Inzidenz für Kolon- und Prostatakarzinome aufweisen und dass sie möglicherweise auch für die Entstehung von Mammakarzinomen prädisponiert sind (7,8,9).

Diagnostiziert wird die Erkrankung häufig im 4.-6. Lebensjahrzehnt. Durch eine schleichende Entwicklung und einer großen Latenz zwischen dem Auftreten erster Symptome und Diagnosestellung, liegen zum Zeitpunkt der Diagnose meist relativ große Adenome vor, die nicht mehr kurativ operiert werden können (10,11).

Ein GH-sezernierendes Adenom der Hypophyse kann auch im Rahmen eines MEN-1 Syndroms (12) oder des McCune-Albright Syndroms (13) auftreten.

#### 1.2. klinisches Bild

Symptome, welche auf die Akromegalie hinweisen können, sind eine allmähliche Vergrößerung und Vergröberung der Akren und einiger Weichteile. Ein Schlaf-Apnoe-Syndrom tritt bei mehr als 50% der Patienten auf (14).

Als Spätfolge ist Augenmerk auf die Viszeromegalie zu legen, da es besonders am Herzen zu einer Kardiomyopathie kommen kann, welche die Lebensqualität zusätzlich einschränkt (6). Auffallend ist ein gesteigertes enchondrales und appositionelles Knochenwachstum. Das Knorpelwachstum im Gelenkbereich, welches durch den Insulin-like Growth Faktor-1 (IGF-1) hervorgerufen wird, führt zu einer Verbreiterung der Gelenkspalten, was wiederum zu nutritiven Störungen mit Knorpeldegeneration führt und die akromegale Arthropathie hervorrufen kann (15).

Bei 80% der Patienten ist infolge der GH-Wirkung eine periphere Insulinresistenz diagnostizierbar, wobei etwa 55% eine verminderte Glukosetoleranz aufweisen und sich bei bis zu 25% im Laufe der Jahre ein Diabetes mellitus entwickelt. Häufiger sieht man diesen bei älteren Patienten mit höheren GH-Spiegeln und einer längeren Krankheitsdauer (4).

Aber nicht nur die GH-Wirkung allein, sondern auch die Tumormasse prägt das klinische Bild. Die direkt durch das Makroadenom (MA) hervorgerufenen Effekte sind eine Vergrößerung der Sella, Kopfschmerzen und, durch Druck des Adenoms auf das Chiasma opticum, eine bitemporale Hemianopsie (16,17).

Die lokalen Raumforderungen des Adenoms können zu einer Insuffizienz der hypophysären Restfunktion führen (17). Weitere Symptome sind mit Häufigkeitsangaben aus der Tabelle 1.2 im Anhang zu entnehmen.

# 1.3. Physiologie und grundlegende Diagnostik

Das GH wird hauptsächlich in Form eines einkettigen Peptidhormons aus der Hypophyse sezerniert (14,18). Den Sekretionsimpuls gibt das Growth hormone-releasing hormone (GHRH) aus dem Hypothalamus. Die Wachstumswirkung des GH wird durch IGF-1 vermittelt, das GH-abhängig vor allem in der Leber gebildet und im Blut an Bindungsproteine gekoppelt transportiert wird (19).

IGF-1, freie Fettsäuren, Glucose und einige Aminosäuren hemmen die GH-Ausschüttung über negative Rückkopplung zum Hypothalamus und stimulieren die hypothalamische Somatostatin (SS)-Freisetzung, welche als Gegenspieler des GHRH inhibitorisch auf die GH-Sekretion wirkt (14).

Die Diagnose der Akromegalie ruht auf den Säulen des klinischen Bildes, der Hormondiagnostik und der Bildgebung. Die Hormondiagnostik basiert auf der Messung stark erhöhter basaler GH-Konzentrationen im Serum, einem pathologischen oralen Glucose-Toleranz-Test (oGTT) und einer Erhöhung des IGF-1 über alters- und geschlechtsspezifische Normalwerte (20).

Der Nachweis einer autonomen GH-Sekretion bei Akromegalie erfolgt durch die fehlende Suppression des Wachstumshormons im oGTT (21).

Als sensitivster Screening-Test gilt die Messung der IGF-1-Konzentration im Serum, die in der Regel 4-10fach erhöht ist. Die Sensitivität eines IGF-1 Wertes für die Diagnose der Akromegalie liegt bei 100%, die Spezifität bei 97% (22).

Die HVL-Funktion sollte mit Hilfe des kombinierten HVL-Tests abgeklärt werden, bei welchem Insulin, Gonadotropin-Releasing Hormon (GnRH) und Thyreotropin-Releasing Hormon (TRH) injiziert werden und weitere Blutentnahmen nach festgesetzten Zeiten erfolgen (5). Der LHRH-Test kann Hinweise auf einen Hypogonadismus geben (23).

Zur Bildgebung wird heute die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT), nativ und mit Kontrastmittel, mit genauer Bestimmung von Lokalisation und Tumorausdehnung verwendet, wobei man zwischen Mikroadenomen (MI) und MA unterscheidet. MI sind dabei all diejenigen Tumore, welche in keiner Ausdehnung eine Größe von 10 mm überschreiten. MA weisen hingegen in mindestens einer Ausdehnung mehr als 10 mm auf (4).

#### 1.4. Therapieziele

Die Therapieziele bestehen darin, den Tumor zu entfernen, die GH- und IGF-1-Konzentrationen zu normalisieren, die übrige hormonelle Funktion der Hypophyse zu erhalten, ein erneutes Auftreten der Symptome zu verhindern, sowie Komplikationen zu vermeiden. Das Erreichen einer GH- und IGF-1-Konzentration, die im Vergleich zu gesunden Personen keine erhöhte Morbidität und Mortalität aufweist steht im Vordergrund.

Als zurzeit gültige Remissionskriterien werden folgende Werte definiert: Die GH-Konzentration im GH-Profil soll im Mittel unter 2,5 µg/l liegen, das GH im oGTT soll bei Verwendung eines Radioimmunassay (RIA) unter 1,0 µg/l und bei Nutzung eines sensitiven immunometrischen Assay (IRMA) unter 0,14 µg/l liegen (24). Zusätzlich werden normale alters- und geschlechtsspezifische IGF-1-Konzentrationen gefordert (25).

Bei Beurteilung eines einzelnen GH-Wertes sollte im Vergleich immer zusätzlich der IGF-1-Wert betrachtet werden, da eine alleinige Erhöhung des GH durch eine Vielzahl anderer Ursachen wie Angst, körperliche Belastung, Anorexia nervosa, Stress, Nieren- und Lebererkrankungen beeinflusst werden kann.

Der aktuell anerkannte Grenzwert für die Suppression des GH im oGTT liegt bei unter 1 μg/l (26). Die postoperative Evaluation sollte frühestens nach 3 Monaten erfolgen.

# 1.5. Therapieformen

Wichtige Behandlungsformen der Akromegalie sind die Operation, die medikamentöse und die Strahlentherapie (25).

#### 1.5.1. operativ

Die Therapie der Wahl ist die selektive transsphenoidale Adenomektomie durch einen erfahrenen Hypophysenchirurgen (27).

Über 90% der Adenome können heute durch diese selektive Herausschälung unter Schonung des übrigen Hypophysengewebes operiert werden. Allerdings ist dieses Verfahren nur ideal bei intrasellären MI von wenigen Millimetern. Vernarbungen nach vorangegangenen Eingriffen und Infiltrationen stehen der radikalen Tumorentfernung oft im Wege (28).

Bei MI wird so in über 80% eine Normalisierung der GH-Konzentration erreicht (27,29,30). Bei invasiv wachsenden MA reichen die Literaturangaben für die Normalisierung der GH-Konzentration von 20% (29) bis 70% (4,23,28,31,32), da häufig der Sinus cavernousus infiltriert und somit nur eine unvollständige Resektion möglich ist.

Freda et al. zeigten 1998 eine Remissionsrate bei MA von 53% (30). Ähnliche Resultate belegten Shimon et al. 2001 mit einer GH-Konzentration unter 2 µg/l bei 64% der MA (33).

Die umfassendste Operationsserie mit 490 Patienten, bei welcher nach modernen Remissionskriterien untersucht wurde, stammt von Fahlbusch et al. (34). Die Remissionsdefinition war ein basales GH unter 2,5  $\mu$ g/l, ein GH-Nadir kleiner 1,0  $\mu$ g/l im oGTT und eine normale IGF-1-Konzentration. Bei allen Adenomen dieser Serie betrug die Remissionsrate nach OP 53%, bei MI 72% und bei MA 74%.

Typische, aber eher seltene (<1%) Komplikationen sind neben dem allgemeinen Risiko der Anästhesie Meningitis, nasale Liquorfisteln und ein Hypopituitarismus. Infolge der fehlenden Hormone kommt es zu sekundären Unterfunktionen der entsprechenden Zieldrüsen, wie Schilddrüse, Nebennierenrinde und den Gonaden, was häufig einen lebenslangen Hormonersatz notwendig macht. Es kann sich auch ein transienter oder permanenter Diabetes insipidus mit Steigerung der Wasserausscheidung entwickeln. Liquorrhoe, Hämorrhagien, Verletzungen der Arteria carotis, postoperative Visus- oder Okulomotorikstörung, Sinusitiden, Meningitiden oder zerebrale Abszesse werden beschrieben (35).

Außer von der Erfahrung des Chirurgen hängt der Erfolg dieser Therapieform von der Größe und Ausdehnung der Tumormasse und der Höhe präoperativer GH-Konzentrationen ab (31,36).

Die Ergebnisse der transsphenoidalen Chirurgie korrelieren negativ mit der Tumorgröße, insbesondere der supra- und parasellären Ausdehnung und der prä- operativen GH-Konzentration (37). Auch bei Rest- oder Rezidivtumoren ist gegenwärtig ein chirurgischer Zweiteingriff primär indiziert. Erst bei nicht befriedigenden Remissionsraten kommen die im folgendem geschilderten adjuvanten Behandlungsstrategien in Betracht (4).

Bei großen extrasellären Tumoren wurde in den letzten Jahren vielfach eine präoperative medikamentöse Therapie mit Octreotid (Oct), einem Somatostatinanalogon (SSA), durchgeführt. Ziel hierbei ist es, innerhalb von wenigen Wochen, eine mögliche Tumorschrumpfung und -erweichung mit besseren operativen Ergebnissen zu bewirken (24,38).

# 1.5.2. Grundlage der präoperativen Therapie

# 1.5.2.1. GH und Somatostatin

Das Wachstumshormon übt seine Wirkung durch Bindung an einen spezifischen, einfach zellmembrangängigen Rezeptor an vielen Organen und Geweben aus. Daher ist dieser Rezeptor ubiquitär im gesamten Körper zu finden. GH bindet zur Aktivierung des Rezeptors an zwei verschiedenen Domänen, was zur Rezeptor-Dimerisierung und damit zur Initialisierung der intrazellulären Signalkette führt.

Das Tetradecapeptid SS aus dem Hypothalamus hemmt die hypophysäre Ausschüttung von GH und ist daher prinzipiell für die Therapie von Erkrankungen mit Hormonhypersekretion geeignet. Dieses Polypeptid kommt in zwei aktiven Isoformen (SRIF-14 und SRIF-28) vor. SS wurde ursprünglich aus Hypothalamusextraktionen isoliert und als potenter GH-Sekretionshemmer identifiziert. Die Halbwertszeit (HWZ) in der Zirkulation beträgt lediglich 1-2 Minuten. SS-Effekte werden über die ubiquitär vorkommenden, folgend beschriebenen G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren vermittelt (4).

Anfangs erhoffte man sich von SS, dass es durch seine inhibierende Wirkung auf die Hormonfreisetzung in der Therapie der Akromegalie eingesetzt werden könnte. Jedoch wurde die klinische Anwendung einerseits durch seine kurze HWZ von weniger als drei Minuten, andererseits durch die Notwendigkeit der Applikation mittels i.v.-Infusion und das Wiederauftreten der Symptome nach Absetzen der Therapie eingeschränkt (39). Aus diesen Gründen wurden SSA auf synthetischem Weg hergestellt, die bessere pharmakodynamische und -kinetische Eigenschaften besitzen (40).

# 1.5.2.2. Somatostatinrezeptoren

Seit der Entdeckung des SS und dessen Interaktion mit einer Familie spezifischer Rezeptoren wurden viele Studien durchgeführt um die Lokalisation der Somatostatin-Rezeptor (sst)-Subtypen in verschiedenen Geweben zu detektieren.

Die sst-Subtypen sind eine Gruppe von G-Protein gekoppelten 7-fach transmenbranären Rezeptoren (41,42).

Die G-Proteine, die durch die Rezeptorbindung aktiviert werden, bestehen aus drei Untereinheiten. Nach Abspaltung der  $\beta$ - und  $\gamma$ - bleibt die  $\alpha$ -Untereinheit übrig, durch welche es in normalen Hypophysen über eine Reaktionskaskade intrazellulär zur Hemmung der Adenylatcyclase und somit zu einer verminderten Ausschüttung des Wachstumshormons kommt (4).

Derzeit sind fünf Somatostatin-Rezeptor-Subtypen identifiziert:  $sst_1$ ,  $sst_2$  ( $sst_{2A}$  und  $sst_{2B}$ ),  $sst_3$ ,  $sst_4$  und  $sst_5$ , die in gesundem und neoplastischem Gewebe, einschließlich endokrinen Tumoren, exprimiert werden (43,44).

Somatostatin bindet mit hoher Affinität an allen fünf sst, Oct bindet nur am Rezeptor-Subtyp 2 mit hoher Affinität und mit geringerer Affinität am sst<sub>5</sub> (45).

Jüngste Studien zeigten, dass die Effektivität des Octreotides von der Somatostatin-Rezeptor-Dichte und dem jeweiligen Subtyp abhängt:

Somatotrophe Adenome weisen eine, im Vergleich zum gesunden Hypophysengewebe, höhere Dichte (> 90%) an sst<sub>2</sub> und sst<sub>5</sub> auf (9). Die Expression der sst<sub>2</sub>-mRNA war in Adenomen, welche nur als partielle Responder definiert wurden, geringer, während die sst<sub>5</sub>-Expression in diesen Adenomtypen höher war im Vergleich zu octreotidresponsiven Tumoren. Einige Studienergebnisse zeigten, dass in octreotid-nonresponsiven Tumorzellen das sst<sub>5</sub>-spezifische Analogon BIM23244 effektiv die GH-Sekretion supprimiert (45).

Studien, welche subtyp-selektive SSA verwendeten zeigten, dass diese beiden Rezeptorsubtypen in der Regulation der GH-Sekretion von menschlichen Hypophysen-adenomen involviert sind (45). Die Subtypen-Expression ist in Tumorgewebe inhomogen und spezifisch für den jeweiligen Tumor. Dies erklärt das individuell unterschiedliche Ansprechen der Adenome auf die Therapie mit SSA (46).

Viele Tumore exprimieren mehr als einen sst-Subtyp, wobei sst<sub>2</sub> in den meisten Geweben dominiert (43).

Miller et al. fanden 1995 bei ihren Untersuchungen in allen normalen Hypophysen und in allen Adenomen sst<sub>1</sub>, sst<sub>2</sub>, und sst<sub>5</sub>, wobei sst<sub>2</sub> dominierte (47). In keinem Gewebe konnte sst<sub>4</sub> nachgewiesen werden, während sst<sub>3</sub> nur in einem Adenomgewebe detektierbar war. In allen GH-sezernierenden Adenomen, welche auf SS in vitro ansprachen, wurde sst<sub>2</sub>, sst<sub>5</sub> und vereinzelt sst<sub>1</sub> gefunden.

Thodou et al. (2006) veröffentlichten eine Untersuchung dieser sst-Subtypen an 90 GH-und / oder Prolaktin (PRL)-sezernierenden Hypophysenadenomen (48). Sie nutzten, wie auch in dieser vorliegenden Studie, für die immunhistochemische Detektion die standardisierte Avidin-Biotin-Komplex-Methode mit polyklonalen Antiseren. Das Team hielt fest, dass die Rezeptoren 2 und 5 in allen Adenomen hochfrequent exprimiert wurden, während die sst<sub>1</sub>-Expression in laktotrophen Adenomen höher war.

Greenman und Melmed untersuchten 1994 die Verteilung der Rezeptor-Subtypen 3, 4 und 5 an 33 Hypophysentumorarten (49). Sie fanden eine Expression des sst $_3$  in 86% der GH-sezernierenden Adenome, in allen non-funktionellen Adenomen (NFA), in allen Prolaktinomen und in 50% der ACTH-produzierenden Tumore. Sst $_4$  war auch in dieser Studie in den meisten Fällen undetektierbar, vor allem in GH-produzierenden Adenomen, hingegen wurde sst $_5$  verstärkt gefunden. Sie schlossen daraus, dass sst $_3$ , aufgrund der weiten Verteilung dieses Subtyps, in der hemmenden Aktivität des SS involviert ist, während sst $_5$  eine wichtige Determinante der GH-Sekretion zu sein scheint.

Diese heterogene Rezeptorenverteilung repräsentiert die morphologische Grundlage einer selektiven pharmakologischen Beeinflussung durch geeignete Liganden in den unterschiedlichen Geweben.

Am sst<sub>2</sub> binden neben den physiologischen Formen auch die zu therapeutischen Zwecken verwendeten synthetischen Analoga des aus 14 Aminosäuren bestehenden Oligopeptids (50).

#### 1.5.2.3. Somatostatinanaloga

SSA bilden im klinischen Alltag einen wesentlichen Bestandteil der nichtinvasiven Therapie der Akromegalie.

Das Somatostatinanalogon Sandostatin® (Octreotid), das aus 8 Aminosäuren besteht, enthält die Aminosäurengruppe des nativen Somatostatins, welche am Somatostatin-Rezeptor bindet.

Mit einer HWZ von 90 min hat es eine mehr als 30fach längere biologische HWZ als das natürliche SS. In einer Dosis von 3 x 50-200  $\mu$ g/d s.c., in retardierter Form mit 10-30 mg i.m. alle 3-4 Wochen oder über eine kontinuierliche 24h-Infusion mittels einer Pumpe wird es erfolgreich zur Hemmung einer überschießenden GH-Sekretion eingesetzt (51).

Während einer Langzeittherapie mit Octreotid lässt sich die GH- und die IGF-1-Konzentration in 65% der Akromegaliepatienten normalisieren (52-55). Unter Oct-Therapie lässt sich eine Tumorregression nachweisen (56).

Die molekularen Mechanismen, welche für eine GH-Senkung auf eine Oct-Therapie bei den einzelnen Patienten determinieren, sind bisher nur inkomplett verstanden (57).

Die erfolgsversprechendsten klinischen Ergebnisse wurden bisher mit Sandostatin LAR® (Octreotidacetat; Octreotid LAR), einem Depotpräparat, erzielt (58,59).

Auch das SSA Lanreotid (Somatuline®) steht für den klinischen Einsatz zur Verfügung. Oct und Lanreotid weisen eine hohe Affinität zum sst<sub>2</sub> und eine mittlere Affinität zum sst<sub>5</sub> auf. Die GH-Sekretionswirkung wird vor allen Dingen über sst<sub>2</sub> vermittelt.

Die SSA hemmen, wie auch das native SS, die Sekretion einiger anderer Hormone und zusätzlich die autonome Sekretion des Wachstumshormons (4).

Oct und Lanreotide führen zu einer Normalisierung der GH-Konzentration bei 56% und 49% und der IGF-1-Konzentration bei 66% und 48% der Patienten (60). Eine Größenzunahme des Tumors lässt sich bei etwa 70% des Patientengutes verhindern (26).

Einige Studienergebnisse sprechen für eine prächirurgische medikamentöse SSA-Therapie:

Colao et al. bildeten aus 59 Patienten zwei Gruppen und fanden eine Verbesserung der postoperativen GH-Werte bei der mit Oct vortherapierten Gruppe (36). Beide Gruppen waren in punkto Adenomgröße, Invasivität und der klinischen Parameter annähernd identisch. Sie konnten bei einigen der vortherapierten Patienten eine signifikante Tumorvolumen (TV)- Abnahme nachweisen. Anhand ihrer Ergebnisse schlugen sie eine 3-6monatige Oct-Therapie prächirurgisch vor, da diese die klinischen Bedingungen für den chirurgischen Erfolg und den postoperativen Klinikaufenthalt positiv beeinflussen könnten.

In einer anderen Studie konnten ebenfalls Calao et al. nachweisen, dass unter präoperativer Therapie mit Oct oder Lanreotide bei 75,5% der Patienten eine Minderung des TV anhand von MRT-Aufnahmen erzielt werden kann (61).

In der Literatur sind aber auch Ergebnisse zu finden, welche nicht für eine präoperative SSA-Therapie sprechen:

Anhand von Daten an 399 Akromegaliepatienten zeigten Losa und Mitarbeiter (62), dass eine präoperative SSA-Therapie nicht als Routine eingesetzt werden sollte. Einschlusskriterien ihrer Fall-Kontroll-Studie waren die GH-Senkung, die Tumorgröße und die Invasivität. Eine Senkung des GH wurde bei 64% erreicht, aber die IGF-1-Konzentration konnte nur bei 19,5% der Patienten gesenkt werden. Eine chirurgische Remission erzielten 56,6% und in der Kontroll-Gruppe 63,6% der Patienten, was kein

signifikantes Ergebnis bedeutet. Regressionsanalysen dieser Studie zeigten, dass eine SSA-Therapie bisher keinen Einfluss auf den operativen Erfolg brachte.

Häufig berichten die Patienten in den ersten Wochen nach Oct-Therapiebeginn über transiente gastrointestinale Symptome mit abdominellen Schmerzen, Malabsorption, Übelkeit, Blähungen, Steatorrhoe oder Durchfall. Zurückzuführen sind diese Beschwerden auf die Suppression der exokrinen Pankreassekretion. Ein erhöhtes Risiko für Cholelithiasis besteht nach längerer Therapie (63,64). Auch chronische Gastritiden und Vitamin-B<sub>12</sub>-Resorptionsstörungen werden in der Literatur unter Therapie mit Oct-LAR beschrieben (65).

Das Arthropathie Risiko kann mittels Oct-Langzeittherapie gesenkt werden (15).

# 1.5.3. weitere Therapiemöglichkeiten

#### 1.5.3.1. postoperative Therapie

Die Indikation zur Pharmakotherapie postoperativ besteht, wenn nach transphenoidaler oder transkranieller Tumorextirpation oder Verkleinerung der Tumormasse kein ausreichender Abfall des GH zu verzeichnen ist. Auch Rezidive werden so mit teilweisem Erfolg therapiert. Die medikamentöse Therapie kann mit SSA, mit Dopaminagonisten (DA), mit GH-Rezeptor-Antagonisten oder als Kombinationen der Medikamentengruppen durchgeführt werden.

Aufgrund einer deutlich besseren Wirksamkeit von SSA wurden die DA weitgehend verdrängt (66).

Des Weiteren steht Pegvisomat, ein GH-Rezeptor-Antagonist, zur Verfügung, welcher bei 90% der Fälle eine Normalisierung der IGF1-Konzentration erreichen kann. Die GH-Werte bleiben aber hoch und eine Tumorschrumpfung wurde bisher nicht beobachtet (17,23,67). Die derzeitige Indikation ist die therapierefraktäre Akromegalie mit chronisch erhöhten IGF-1-Konzentrationen (26,67).

Bei Patienten, die zusätzlich einen Diabetes mellitus aufweisen, wird Pegvisomat verwendet, da bisher keine direkte Beeinflussung der Insulinsekretion beobachtet wurde.

Eine Strahlentherapie ist eine sekundäre Therapieoption (68). Damit kann bei 90% des Patientenguts eine GH Senkung unter 5 µg/l erreicht werden, ein Effekt auf die IGF-1-

Konzentration wird nicht erzielt (23,27). Die "stereotaktische Radiochirurgie" mittels eines Linearbeschleunigers oder mit dem "Gamma-Knife", einer <sup>60</sup>Cobalt-Bestrahlungseinheit speziell für Kopftumore, sind neuere Entwicklungen, welche auch in Langzeitstudien hohe Remissionsraten zeigen (4,68,69).

Mit diesen Methoden kann vor allem bei invasiv wachsenden, subtotal resezierten Adenomen eine Kontrolle des GH von etwa 80-90%, bei vertretbaren Nebenwirkungen, erreicht werden.

Nachteilig an dieser Therapieform ist, dass eine Senkung der GH-Konzentration sehr langsam erfolgt und die gewünschten Effekte erst nach mehreren Jahren erreicht werden (50,70).

Bei der Akromegalie führt keine der gegenwärtigen Therapieformen allein zu ausreichenden Remissionsraten.

# 1.6. Fragestellung der Arbeit

Das Somatostatinanalogon Octreotid bindet bevorzugt am sst<sub>2</sub> und in geringerem Umfang am sst<sub>5</sub>. Obwohl diese beiden Rezeptor-Subtypen beständig in GH-sezernierenden Adenomen exprimiert werden, kann Octreotid die GH-Sekretion in lediglich 65% der Patienten mit Akromegalie kontrollieren.

Während einer Therapie mit SSA kommt es bei 38% der Patienten zu einer signifikanten Tumorvolumenreduktion. Dies ist wahrscheinlich, nach Beurteilung bisheriger Studien, über sst<sub>3</sub> und / oder sst<sub>2</sub> möglich.

Die molekularen Mechanismen, welche zu einem Verlust der Octreotid-Response bei einem Drittel der Patienten führen, sind bisher nur inkomplett verstanden.

- In Anbetracht der aufgeführten bisherigen Therapiemöglichkeiten mit SSA stellt sich die Frage, warum bestimmte Patienten sehr gut auf die medikamentöse SSA-Therapie ansprechen und andere Patienten keine Reaktion bezüglich Symptomatik und Laborparameter zeigen.
- Die allenfalls marginalen Vorteile einer präoperativen SSA-Therapie werfen die Frage nach einem prädiktiven Parameter auf, welcher eine Auswahl individueller Patienten ermöglichen kann.

Wie unterscheiden sich also die Hypophysenadenome von den einzelnen Patienten mit Akromegalie?

- In Frage k\u00e4me der Nachweis einer hohen Dichte an bestimmten Somatostatin-Rezeptor-Subtypen als m\u00f6glicher Pr\u00e4diktor des Ansprechens auf Octreotid bez\u00e4glich der GH- und der Tumorvolumenabnahme.
- Um diese Frage zu klären, wurde in dieser Arbeit die Expression der vier in Hypophysenadenomen vorhandenen Somatostatin-Rezeptor-Subtypen immunhistochemisch auf Proteinebene mit der standartisierten Avidin-Biotin-Komplex-Methode an Patienten mit einer vorausgegangenen Langzeit Oct-Therapie untersucht und mit einer Kontrollgruppe verglichen.

Die Rezeptor-Subtyp-Bestimmung erfolgte anhand zweier Gruppen. Eine Gruppe wurde mit SSA vorbehandelt. Die Patienten erhielten Octreotiddosen von 300-1500 μg/d. In der anderen, etwas kleineren Gruppe, wurde Tumorgewebe nach primärer Operation, das bedeutet ohne medikamentöse Vorbehandlung oder anderer, oben genannter, Therapieoptionen, in Paraffin eingebettet. Diese Gruppe diente als Kontrollgruppe für die immunhistochemischen Färbungen.

Von dieser Studie erwarten wir eine Erkenntnis, inwieweit sich die Verteilung der sst-Subtypen zwischen Patienten mit erfolgreicher Senkung der GH-Konzentration durch eine präoperative Therapie mit SSA von Patienten ohne medikamentöse SSA-Therapie unterscheiden.

Einen Zusammenhang zwischen der Tumorvolumenabnahme und der Expression von sst-Subtypen soll ebenfalls herausgearbeitet und in Bezug zur bisherigen Literatur gesetzt werden.

#### 2. Methodik

## 2.1. Diagnostische und therapeutische Definitionen

Wie auch in anderen Studien werden alle Tumore, die in keiner Abmessung (Höhe, Breite, Tiefe) eine Größe über 10 mm zeigen, als Mikroadenome bezeichnet.

Sobald ein Durchmesser größer als 10 mm ist, spricht man von einem Makroadenom.

In der vorliegenden Studie gilt für MI, dass diese innerhalb der Sella turcica liegen und die Grenzen dieser somit nicht überschreiten.

Als Basalwerte bei den Hormonbestimmungen werden die Nullwerte des jeweiligen Tests bezeichnet, welche identisch mit dem Ausgangswert des Hormon-Profils sind.

Von einer Vollremission der Erkrankung Akromegalie spricht man, wenn folgende Werte erreicht sind: eine supprimierte GH-Konzentration im oGTT unter 1 µg/l und ein IGF-1 im Normalbereich für das jeweilige Alter und Geschlecht (26).

Die biochemische Ansprache auf die durchgeführte Oct-Therapie wurde definiert als ein Abfall der mittleren GH-Konzentration um mindestens 50% während eines 8h/9-Punkte Profils.

Ein gleichmäßiger Abfall des Mittelwertes (MW) des GH-Profils von mehr oder gleich 50% wurde definiert als ein Ansprechen auf die medikamentöse Therapie. Diese Patienten werden als GH-Responder (GHR) deklariert, jene, die einen Abfall der GH-Konzentration < 50% zeigten, sind GH-non-Responder (GHNR).

Eine medikamentös induzierte Tumorverkleinerung ist dann erreicht, wenn das TV um mindestens 20% gegenüber dem Basalwert, mittels MRT ermittelt, verringert wurde (71). Diese Patienten werden als Tumor-Volumen-Responder (TVR) bezeichnet.

Die Berechnung des TV erfolgte nach der Formel von Di Chiro und Nelson (71): Dabei wird immer die längste Ausdehnung des Tumors benutzt.

$$V = \frac{h \times l \times w \times \pi}{6}$$

V...Volumen

h... Höhe

I... Länge

w...Weite

MRT Aufnahmen, welche mit T1 gewichteten S1 Sequenzen mit 3 mm Schichten in coronarer und sagittaler Ebene gefahren wurden, als native Aufnahmen sowie mit Gadolinum-DTPA (0,1 mMol/kg KG) zur Tumorklassifikation erfolgten basal und nach medikamentöser Therapie und wurden für jeden Patienten individuell standardisiert.

Das Enhancement betrug 1,5 Tesla. Die verwendete MRT war ein Magnetom der Firma Siemens Erlangen aus Deutschland.

Non-Responder (NR) sind all diejenigen Patienten, die keinen oder einen geringeren Abfall des oben genannten Tumorvolumens zeigen.

# 2.2. Patientengut

# 2.2.1. Alter und Geschlecht

Die Untersuchungen der vorliegenden Studie wurden an zwei Patientengruppen durchgeführt.

Gruppe A, bestehend aus 14 Patienten, die ausschließlich chirurgisch behandelt wurde, diente als Vergleichsgruppe für die Immunhistochemie (IHC) der sst-Subtypen.

Gruppe B, bestehend aus 20 Patienten, bekam eine medikamentöse präoperative Therapie mit Oct (Sandostatin ®) über einen Zeitraum von drei bis neun Monate.

Gruppe A besteht aus jeweils sieben Frauen und Männern mit einem mittleren Lebensalter bei Diagnosestellung von 48,3 Jahren.

Gruppe B, bestehend aus 12 Frauen und acht Männern, wies ein mittleres Lebensalter von 41,8 Jahren auf.

Insgesamt überwogen in beiden Gruppen Frauen im Verhältnis 19/15 (Faktor 1,27).

#### 2.2.2. primär versus sekundär Operierte

Die 14 Personen aus Gruppe A waren Patienten, welche primär transsphenoidal operiert wurden. Keiner der Teilnehmer bekam vorher eine medikamentöse SSA Therapie oder wurde anderweitig vorbehandelt.

Das Patientengut aus Gruppe B erhielt über unterschiedliche Zeiträume präoperativ das SSA Octreotid s.c. Mit einem Mittelwert von 5,6 Monaten (3-9 Monate). Die mediane Oct-Dosis betrug 1250  $\mu$ g/d, mit einem Minimum (Min) von 300  $\mu$ g/d und einem Maximum (Max) von 1500  $\mu$ g/d.

Keiner dieser Patienten erhielt zusätzlich eine Strahlentherapie oder eine andere medikamentöse Behandlung bevor er in diese Studie aufgenommen wurde. Direkt nach der letzten Oct-Injektion am Vorabend wurden die Adenome chirurgisch entfernt und in Paraffin eingebettet, um daraus später die Schnitte für die immunhistochemische Untersuchung zu fertigen.

Zur GH-Konzentrationsbestimmung wurden in Gruppe B, aufgrund der unterschiedlichen Kliniken, trotz identischer Therapieschemen, verschiedene Assays von den Laboren genutzt. Bei den Patienten 1-15 und 16-20 wurden jeweils gleiche Assays verwendet, so dass in Gruppe B zwei Untergruppen gebildet wurden (B1 und B2), welche vergleichbar sind. Daher sind die GH- und die IGF-1-Konzentrationen nur qualitativ vergleichbar.

Nach der Tumorextirpation wurden alle Patienten innerhalb sechs Wochen ärztlich gesehen, untersucht und befundet.

#### 2.2.3. Adenomgröße

Per oben genannter Definition wurde zwischen MI und MA unterschieden.

Gruppe A wies neun MA und fünf MI auf, während in der medikamentös therapierten Gruppe 19 MA, darunter ein "Giant Adenom" mit einem Volumen über 10 cm<sup>3</sup>, und nur ein MI zu finden waren.

Die Tumorklassifikation erfolgte anhand der WHO-Klassifikation von 2004.

#### 2.3. Laborwerte der Patienten

#### 2.3.1. Mittelwerte der GH-Konzentration

Die GH-Konzentrationen der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Diagnose wurden kategorisiert als größer oder kleiner 5  $\mu$ g/l. Genauere Werte standen nicht zur Verfügung.

Die GH-Konzentration in Gruppe B wurde mit Hilfe zweier kommerziell erhältlicher Radioimmunoassays bestimmt. Bei der Berechnung der Mittelwerte wird der Standarderror (SE) angegeben.

Bei der 20 Personen fassenden medikamentös vortherapierten Gruppe lag der GH-Mittelwert (GH-MW) der Patienten Nummer 1-15 (Gruppe B1) zum Diagnosezeitpunkt,

wie aus Tabelle 6.2 des Anhangs zu entnehmen, bei 42,93  $\pm$  6,5  $\mu$ g/l. Bei den anderen 5 Patienten (Gruppe B2), welche mit einem anderen Assay untersucht wurden lag der GH-MW bei 41,58  $\pm$  16,4  $\mu$ g/l. Der MW der Teilgruppen insgesamt lag bei 42,3  $\pm$  9,27  $\mu$ g/l.

Ein Patient der Gruppe B1 wies einen basalen GH-Wert von mehr als 100  $\mu$ g/l (127, 9  $\mu$ g/l) auf.

Zum Zeitpunkt der letzten Messung vor der chirurgischen Tumorextirpation lag der GH-MW in den Teilgruppen bei 9,0  $\pm$  2,4  $\mu$ g/l (B1=10,05  $\pm$  2,3  $\mu$ g/l, B2 = 7,86  $\pm$  2,9  $\mu$ g/l). Die höchste hier noch gemessene GH-Konzentration lag bei 33,0  $\mu$ g/l.

Bei fünf von 20 Patienten (25%) zeigte sich vor chirurgischer Therapie ein GH-MW unter 2,5 μg/l. Dies ist mit einer partiellen Remission gleichzusetzen. Hier fand sich zusätzlich lediglich bei einem Patienten auch die IGF-1-Konzentration im Normbereich.

#### 2.3.2. Tumorvolumina

Für Gruppe A lagen keine Tumorvolumina vor, da diese bei primär chirurgischer Therapie nicht routinemäßig bestimmt wurden.

Zum Zeitpunkt der Diagnose lies sich ein MW von 7595,4 ± 1887,1 mm <sup>3</sup> in Gruppe B1 mittels MRT ermitteln.

Von den fünf Patienten der Gruppe B2 waren keine Bildgebungen im Archiv verfügbar, nur die TV-Reduktion für die spätere Auswertung konnte uns für diese Studie zur Verfügung gestellt werden.

In Gruppe B1 fand sich bei einer männlichen Person ein Höchstwert von 55890,5 mm<sup>3</sup>, das kleinste Volumen einer Patientin lag bei 783,3 mm<sup>3</sup>.

Zehn aller medikamentös behandelten Patienten, insgesamt 66,7%, wiesen Volumina zwischen 3000 und 6000 mm<sup>3</sup> auf.

Zur letzten Volumenbestimmung mittels MRT unter medikamentöser Therapie lag der Mittelwert der 15 Patienten von Gruppe B1 bei  $4412,0\pm994,1$  mm  $^3$ . Der Spitzenwert bei dem gleichen männlichen Patienten lag nun bei 27770,3 mm  $^3$ , der Tiefstwert bei 586,4 mm  $^3$ .

Ein TV zwischen 3000 und 6000 mm <sup>3</sup> zeigten noch 27% (vier) der Patienten, neun Patienten wiesen nach der SSA Therapie ein TV unter 3000 mm <sup>3</sup> auf. Diese Werte sind alle in Tabelle 6.3 im Anhang ersichtlich.

# 2.4. Diagnose der Akromegalie

Die Diagnose der Akromegalie stützt sich auf die Suppression des GH im oGTT.

Da ein gemessener Einzelwert des Wachstumshormons aufgrund pulsatiler Freisetzung nicht für die Diagnose ausreicht, erfolgt die Durchführung des oGTT mit 75 g Glucose. Dabei wird dem Patienten innerhalb von fünf Minuten die Glucoselösung oral verabreicht. Es schließen sich Blutentnahmen zu den Zeitpunkten 0, 30, 60, 90 und 120 min zur Blutzucker- und GH-Konzentratinsbestimmung an. Eine Reduktion des GH auf einen Nadir unter 1 ng/ml schließt eine autonome GH-Produktion aus. Bei Patienten mit autonomer GH-Sekretion kann es zwar zu einer Teilsuppression des GH kommen, der oben genannte Nadir-Wert wird jedoch nicht erreicht (4,72,73).

Die pathologisch erhöhte GH-Sekretion führt zu einer erhöhten IGF-1-Konzentration (74).

**Tabelle 2.4.1:** altersbezogene Normalwerte des IGF-1 in ng/ml (MW + SE)

Alter in	IGF-1-
Jahren	Konzentration
20-30	198 (115 – 341)
30-40	188 (109 – 324)
40-50	178 (103 – 307)
50-60	169 ( 97 – 294)
60-70	161 ( 91 - 284)

#### 2.5. Zeiträume der Untersuchungen

In Gruppe B erfolgte die Messung basal, das heißt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Dabei wurden ein GH-Profil, die IGF-1 Messung und ein GH-oGTT durchgeführt sowie magentresonaztomographische Aufnahmen angefertigt.

Weitere Messungen der gleiche Parameter erfolgten unmittelbar präoperativ unter SSA-Therapie und postoperativ.

# 2.6. experimenteller Teil

Das in dieser Studie verwendete Hypophysengewebe stammt von chirurgisch resezierten Hypophysenadenomen von Akromegaliepatienten. Das in jeder Färbung der sst-Subtypen zur Kontrolle mitgeführte Pankreasgewebe wurde aus humanen Bauchspeicheldrüsen gewonnen. Dies wurde vom pathologischen Institut in Magdeburg zur Verfügung gestellt.

Um unsere beiden Gruppen direkt bezüglich der Rezeptor-Subtypen vergleichen zu können, sind die wie folgt beschriebenen Arbeitsschritte notwendig.

# 2.6.1. Assays für die Diagnostik

Im Labor wurden zur Hormonbestimmung die folgenden zwei Assays genutzt:

Für die GH-Bestimmung der Patienten 1-15 von Gruppe B1 der RIA, Sorin, Sallugia, Italy, mit einer Internationalen Referenz-Präparation (IRP) von 80/505. Die Standartkurven dieses Assays liegen zwischen 0,5-50,0 µg/l. Die Intra- und Interassy Koeffizients-Abweichungen betragen 4,9% und 3,8%.

Für die Patienten 16-20, Gruppe B2, wurde ein Immunometrischer Assay der Firma Nichols Institute Diagnostics GmbH, Bad Nauheim, Deutschland verwendet. Dieser Assay ist ebenfalls für humanes GH nach internationalem Standart der WHO (80/505) kalibriert. Intra- und Interassaykoeffizienten lagen bei 5,4% und 7,9%.

Das IGF-1 wurde einerseits (Gruppe B1) mit Hilfe des RIA-CT, Mediagnost, Reutlingen, Deutschland mit einer Assaysensitivität von  $0.1~\mu g/l$  und einer Intra- und Interassy Koeffizients-Variation von 7.2% und 8.6% bestimmt. Andererseits wurde in Gruppe B2 der immunometrische Assay, Nichols Institute Diagnostics GmbH, Bad Nauheim, Deutschland, mit einer Assaysensitivität, einer Intra- und Interassy Koeffizients-Variation von  $6~\mu g/l$ , 5.2% und 5.7% eingesetzt.

Die altersentsprechenden mittleren Normwerte des IGF-1 zeigen, wie aus Tabelle 2.4.1 ersichtlich, für alle Altersklassen unterschiedlich festgelegte Normalbereiche.

Die Serum-Glucose-Konzentration wurde mit einer Glucose-Oxidase Methode mit dem Glucose Analyzer II von Beckmann Instruments, Brea, CA gemessen.

Die Bestimmung der übrigen Laborwerte erfolgte durch Standartmessungen.

# 2.6.2. Herstellung der Paraffinblöcke

Das chirurgisch entnommene Tumorgewebe der Hypophysenadenome wurde sofort nach der Operation in 4%igem phosphatgepuffertem Formalin fixiert und nach der Dehydratation mittels einer Ethanolreihe in Paraffin-Wachs eingebettet (4). So entstanden Paraffinblöcke einer Größe von etwa 3 x 2 x 0,3 cm.

Aus diesen Präparaten wurden 5-7 µm dicke Schnitte der Hypophysenadenome mittels eines Mikrotoms von Leica gewonnen und vor den Färbungen für diese Arbeit auf Super Frost / Plus Objektträger der Firma Menzel (Braunschweig, Deutschland) aufgetragen.

Als Kontrolle wurde in jeder Färbung normales Hypophysen- und Pankreasgewebe genutzt, welches nach der operativen Exstirpation analog zum Tumorgewebe fixiert und in Paraffin eingebettet wurde.

Das Pankreasgewebe stammt von Pankreaskarzinompatienten, bei welchen das Karzinom im Gesunden reseziert wurde. Aus solchen Operationspräparaten wurden 10-20 Paraffinblöcke angefertigt. Einige davon enthielten Normalgewebe, diese Schnitte wurden für die vorliegende immunhistochemische Untersuchung genutzt.

# 2.6.3. Antikörpergewinnung und Affinitätsreinigung

Die Peptidsynthesen und die Antiserengewinnung der speziell erzeugten polyklonalen Primär-Antikörper (AK) vom Immunglobulin G-Typ (IgG) wurden von der Firma Gramsch Laboratories, Schwabhausen, durchgeführt.

Dazu wurden die jeweiligen Peptide, gekoppelt an Hemocyanin, drei- bis sechsmal im Abstand von drei Wochen in ein Kaninchen injiziert. Nach einigen Wochen wurde dem immunisierten Kaninchen Blut entnommen und zentrifugiert. Dieses so gewonnene Serum, jetzt Antiserum, enthält die gewünschten polyklonalen Antikörper. Dieses Antiserum kann direkt verwendet oder wie in unseren Untersuchungen zusätzlich, wie unten beschrieben, säulenchromatographisch gereinigt werden (74-76).

Die sst-Subtyp spezifischen Antiseren wurden gegen die carboxyterminale Aminosäure-Sequenz erzeugt. Die Identität dieser Peptide ist in Tabelle 2.6.3.1 gezeigt.

**Tabelle 2.6.3.1:** Aminosäurensequenz der COOH-terminalen Region des humanen Somatostatin-Rezeptors

sst <sub>1</sub> (357-391)	alksraysvedfqpenlesggvf <u>rngtctsrittl</u> *
sst <sub>2A</sub> (335-369)	Tddgersdskqdksrlnett <u>etqrtllngdlqtsi</u>
sst <sub>3</sub> (384-418)	ggqerppsrvaskeqqllpqeastgeksstmrisyl
sst <sub>4</sub> (354-388)	Kggagcmcpplkcqqealqpepgrkripltrtttf
sst <sub>5</sub> (330-364)	adateprpdrirqqqeatppahraaanglmqtskl

<sup>\*</sup>Die Aminosäurensequenzen der Peptide, korrespondierend zum COOH-terminalen Ende, für die Immunisierung der Kaninchen zur Antikörperproduktion sind unterstrichen.

Im gewonnenen Serum befanden sich neben den erzeugten Peptidantikörpern weitere AK sowie Serumbestandteile, welche die Immunpräzipitation oder Immundetektion beeinflussen konnten. Deshalb wurden die C-terminalen Peptidantikörper für die Präzipitationsstudien mittels einer Affinitätschromatographie säulenchromatographisch von störenden Serumbestandteilen getrennt. Das heißt, dass die Molekülmischung die Affinitätschromatographiesäule passierte und dabei diejenigen Moleküle adsorbiert wurden, die mit dem trägergebundenem Liganden reagieren könnten. Nichtgebundene Moleküle wurden ausgewaschen (74).

Um die Molekülbindung zu verbessern, sind in unserer Untersuchung die AK über einen Spacer mit der Matrix verknüpft gewesen.

#### Affinitätschromatographie

Für diese Untersuchung wurde ein kommerziell erhältliches SulfoLink-Kit der Firma Pierce, USA verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Das SulfoLink-Kopplungsgel bindet spezifisch die Sulfhydrylgruppe des Antigen-Peptids, an das sich dann der AK anlagert.

2 ml der SulfoLink-Gelsuspension wurden in die Säule pipettiert und mit 12 ml Kopplungspuffer equilibriert. Anschließend wurden 1-10 mg des reduzierten Peptids, gemischt in Probenaffinitätspuffer, in die Säule gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur (RT) auf dem Schüttler belassen. Ein Auslaufen der Pufferlösung erfolgte nach weiteren 30 min Inkubation ohne Bewegung. Das Gel wurde mit 6 ml Kopplungspuffer gewaschen und die Säule mit 2 ml Cysteinpuffer (Pierce) beschickt.

Eine Besetzung der nichtspezifischen Bindungsstellen mit dem Cysteinpuffer erfolgte durch 15minütiges Schütteln und 30minütige Inkubation ohne Schütteln. Anschließend wurde die Säule mit 16 ml Waschpuffer (Pierce) und mit 16 ml 0,05% Natriumazid (Sigma) gewaschen.

Bevor das Antiserum auf das Gel appliziert wurde, erfolgte eine Equilibrierung der Säule mit 6 ml Phosphat-Buffered Saline (PBS). Das Gel wurde 1 h bei RT inkubiert, nachdem 1 ml des Serums vollständig in das Gel eingezogen war. Nach erneuter Waschung mit 16 ml PBS, erfolgte die Elution der gereinigten AK mit 8 ml Eluierungspuffer (Pierce). Es wurden jeweils Fraktionen von 1 ml aufgefangen und mit 50  $\mu$ l 1 M Tris-HCl (pH 9,5) neutralisiert.

Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt, die Proben mit den höchsten Protein- bzw. IgG-Konzentrationen wurden in PBS über Nacht bei 4℃ dialysiert und aliquotiert bei -20℃ eingefroren.

Um das Gel von den noch vorhandenen Proteinspuren zu reinigen, wurde die Säule erneut mit 16 ml PBS gewaschen und mit 1 M Natriumchloridlösung, die 0,05% Natriumazid zur Konservierung enthielt, equilibriert. Das Gel wurde in dieser Lösung bis zum nächsten Gebrauch bei 4 °C aufrecht gelagert.

Der Titer und die Spezifität der affinitätsgereinigten Antiseren wurden durch eine schnelle und empfindliche Analyse, das Dot-Blot-Verfahren mit Hilfe der Peptide, gegen die die AK erzeugt worden sind, überprüft. Dabei wurden die Peptide direkt mit Hilfe einer kleinen Kammer auf die Nitrozellulose aufgetragen und anschließend geblottet.

Für Adsorptionskontrollen der AK wurden Antiseren mit 10  $\mu$ g/ml ihres konjugierenden Peptids für zwei Stunden bei RT preinkubiert. Die Charakterisierung der C-terminalen anti-sst<sub>2A</sub>- und der humanen anti-sst<sub>3</sub>-Antiseren erfolgte nach Schulz et al. 1998 und 2000 (77,78).

#### <u>Immunzytochemie</u>

Plasmide, welche die humanen Rezeptor-Subtypen 1, 2A, 3 und 5 kodieren, erhielten wir von www.cdna.org (UMR cDNA Resource Center, Rolla, MO). Menschliche embryonale Nierenzellen 293 (HEK-293) wurden transferiert und über Nacht auf Deckgläschen gezüchtet. Anschließend wurden diese Zellen fixiert und mit 1 μg/ml antisst<sub>1</sub> {9498}, anti-sst<sub>2A</sub> {0786}, anti-sst<sub>3</sub> {4823} oder anti-sst<sub>5</sub> {0917} Antikörpern, gefolgt

von Cyanin 3.18-konjugierten Sekundär-AK (Amersham, Braunschweig, Deutschland) inkubiert.

Die Proben wurden auf Objektträger befestigt und mit einem TCS-NT Laser-Konfokal-Mikroskop der Firma Leica betrachtet (77,78).

#### 2.6.4. Western Blot Analyse

Western Blot Verfahren werden zur Bestimmung kleiner Mengen eines bestimmten Proteins in Zellen aus Gewebelysaten genutzt (74-76). Nach Auftrennung der Proteine, abhängig von ihrer Größe, im elektrischen Feld werden sie auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert. Auf der Membran erfolgt der Nachweis des Proteins mittels eines spezifischen AK. Der gebundene erste Antikörper wird durch einen zugegebenen zweiten AK, der entweder radioaktiv markiert oder wie in dieser Untersuchung an das Enzym Peroxidase gekoppelt ist, detektiert.

Die verwendeten Gewebe wurden sowohl von den transferrierten HEK-293-Zellen, als auch von frischem Tumorgewebe präpariert.

Primär wurde das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 ℃ gelagert. Anschließend erfolgte die Homogenisierung dieser Gewebe.

Dazu wurden diese in Homogenisationspuffer verbracht (5 mM EDTA, 3 mM EGTA, 250 mM Sucrose und 10 mM Tris-HCL [pH 7,6] aus 1 mM Phenylmethylsulfonyl-fluorid, 1 μM Pepstatin, 10 μg/ml Leupeptin, 2 μg/ml Aprotinin). Durch Zentrifugation des Homogenats bei 500 x g für 5 min und 4  $^{\circ}$ C wurden ungebrochene Zellen und Zellkerne entfernt. Es folgte eine Zentrifugation bei 20.000 x g für 30 min bei 4  $^{\circ}$ C und eine Auflösung der Membranen in Lysis-Puffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 3 mM EGTA und 20 mM HEPES [ph 7,4] aus 4 mg/ml Dodecyl- $\beta$ -Maltose und Proteinaseinhibitor).

# **Proteinbestimmung**

Die Proteine wurden mit Hilfe der BCA Methode (Bicinchoninsäure) laut Anweisung der Hersteller (Pierce, Rockford, IL) bestimmt. Dieses indirekte Verfahren beruht auf der Reduktion von zweiwertigem zu einwertigem Kupfer durch das reduzierende Potential von Peptidbindungen. Die Bicinchoninsäure bildet dabei spezifisch mit dem zweiwertigen Kupfer einen Farbkomplex, der sein Absorbtionsmaximum bei 562 nm hat. Dies ermöglicht einen sensitiven, kolorimetrischen Nachweis von Proteinen.

Die Intensität des Farbkomplexes wurde spektralphotometrisch gegen einen Blindwert gemessen und die Proteinkonzentrationen aus der Standardkurve, die zuvor mit einem Standard aus Rinderserumalbumin (BSA) angelegt wurde, errechnet.

# Isolierung der Glykoproteine mittels WGA

Nach Homogenisierung der Gewebe erfolgt eine Inkubation für 90 min mit 150 μl Weizen-Keim-Lecithin-Agarose von Vector Laboratories bei 4°C und eine Waschung in Lysierungspuffer. Adsorbierte Glykoproteine wurden mit Natrium-Sulfat-Puffer während einer Inkubation von 60 min bei 37°C herausgelöst.

Die meisten Membranproteine besitzen viele Glykosilierungsstellen, an welche die Weizenkeim-Sepharose-Kügelchen (WGA) binden können. Zu 100 μl Weizenkeimagglutinin, das an Agarosekügelchen gekoppelt ist, wurden 1 ml Lysat-Detergenz-Puffer zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 4°C für zwei Stunden auf dem Schüttler. Die Kügelchen mit den adsorbierten Glykoproteinen wurden nach kurzem Zentrifugieren bei 14.000 X g sedimentiert und fünfmal mit kaltem Detergenz-Puffer gewaschen. Die gereinigten Proteine wurden in 100 μl Sodiumdodecylsulfat (SDS) -Probenpuffer und zusätzliches Erhitzen für 20 min bei 60°C von den Kügelchen gelöst. Danach folgte, wie nachfolgend beschrieben, die Auftrennung und Antikörpermarkierung der Proteine (78).

#### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gewebeproben wurden zunächst einer 8%igen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese in einem Tris-HCI-Glycin-Puffersystem mit Hilfe des "Protean II Elektrophoresesystems" der Firma Biorad unterworfen.

Das SDS bildet einen negativ geladenen SDS-Proteinkomplex mit konstantem Ladungs-Masse-Verhältnis. Die Bildung der Quartärstruktur der Proteine ist dadurch unterbunden, sodass die Komplexe im elektrischen Feld zum Pluspol wandern. Dabei trennt der Siebeffekt eines porösen Polyacrylamidgels die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Radius, und damit nach ihrem Molekulargewicht, auf.

Diese Methode ermöglicht hohe Auflösungen und Bandenschärfen der einzelnen Proteine. Vor dem Auftragen werden die Proben in einem SDS-haltigem Puffer erhitzt. Nachdem das anionische Detergenz SDS das geladen vorliegende Protein umhüllte, war eine Trennung nach dem Molekulargewicht möglich.

Es wurden Gele mit unterschiedlichen Acrylamid-Konzentrationen verwendet, da somit die zu untersuchenden Proteine in unterschiedlichen Molekularbereichen getrennt

werden konnten. Für die elektrophoretische Trennung der sst-Subtypen wurden Trenngele mit einem 6; 7,5 oder 8%igem Acrylamid-Gehalt verwendet. Die Sammelgele waren für alle Anwendungen gleich.

Jeweils gleiche Proteinmengen (ca. 100 µl) der Proben in SDS-Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 20% Glycerol, 100 mM DL-Dithiothreitol, 0,005% Bromphenolblau) wurden in die Vertiefungen der Sammelgels pipettiert. Zusätzlich zu den Proben wurde auf jedes Gel der Molekulargewichts-Standard "Precision Protein Standards", "BioRad", "Roti-Mark" der Firma Roth aufgetragen, welcher definierte Banden zwischen 10 und 200 kDa anzeigte.

Die Elektrophorese des 1,5 cm dicken 14 cm Gels wurde über Nacht bei einer Stromstärke zwischen 8 und 10 mA durchgeführt, bis die bromphenolblaue Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte (79).

Abschließend erfolgte eine Trennung des Gels von den Glasplatten und eine Einlage dieses Gels in Anodenlösung I (0,3 M Tris, 20% Methanol).

# Übertragung der Proteine auf Nitrozellulosemembranen

Nach der elektrischen Auftrennung der Proben in der Anodenlösung wurden die Proteine aus der Gelmatrix des Trenngels auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und dort immobilisiert. Die Übertragung erfolgte durch das Halbtrocken-Blotverfahren, wobei Gel und immobilisierende Membran zwischen, zuvor in Transferpuffer, getränkte Filterpapiere gelegt wurden, die direkten Kontakt zu zwei horizontalen Graphitplatten-Elektroden hatten (80).

Auf die Anode der Blotting-Apparatur wurden auf drei Lagen in Anodenlösung I getränktes Filterpapier zuerst die Nitrozellulosemembran (zuvor 30 min in Anodenlösung I eingelegt) und dann das Gel aufgebracht, auf das anschließend sechs Lagen in Anodenlösung II (25 mM Tris, 20% Methanol) getränkte Filterpapiere und neun in Katodenlösung (40 mM 6-Aminocapronsäure, 20% Methanol) getränkte Filterpapiere übereinander gelegt wurden.

Beim Aufbau des Blotstapels wurden Luftblasen mit Hilfe eines Handrollers herausgewalzt. Auf die obere Schicht wurde die Kathode der Apparatur aufgesetzt und die Stromversorgung eingerichtet.

Die Transferzeit, die abhängig von der Porengröße des Gels und des Proteingehaltes ist, betrug ca. 2 h und die angelegte Stromstärke, abhängig von der Gelgröße, wurde wie folgt errechnet:

Betriebsstromstärke [mA] = Fläche des Gels [cm<sup>2</sup>] x 0,85 [mA].

Folgend wurde zur Anfärbung der Proteine des Molekulargewichts-Standards die Nitrozellulosemembran aus der Blotapparatur entnommen und in eine Lösung, die 0,5% PonceauS (Sigma, Steinheim) und 1% Eisessig enthielt, für 10 min eingelegt.

Die Markierung der angefärbten Banden erfolgte mit einem Kugelschreiber.

Um die freien Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran zu blockieren folgte eine Inkubation für ca. 2 h in einer Lösung aus 5% fettfreiem Milchpulver in PBS-T (Phosphat-Buffered Saline (PBS), pH 7,4, 0,1% Tween). Anschließend wurde die Membran gründlich mit PBS-T gewaschen und mit der AK-Lösung in PBS-T über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach abschließendem 30minütigem Waschen in PBS-T wurde für 2 h der sekundäre AK, der an Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, zugegeben, und der Komplex mit dem verstärkten Chemilumineszenz-System detektiert.

# Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe

Für die Detektion der AG-AK-Komplexe mit dem verstärkten Chemilumineszenz-System im Immunoblot wurden kommerziell erhältliche Detektionslösungen der Firma Amersham verwendet. Zuerst wurden die Proteine gebunden und mit AK detektiert. Der Nachweis des Primär-AK erfolgte mit einem peroxidase-markierten Sekundärantikörper. Diese Peroxidase verarbeitet Luminol, welches in der Lösung enthalten ist. Dadurch wird bei der Oxidation mit dem Wasserstoffperoxid der zugegebenen Lösung eine Chemilumineszenz entwickelt. In der zweiten Lösung befindet sich neben dem Substrat der Meerrettichperoxidase, dem Wasserstoffperoxid, eine Verstärkersubstanz (Amersham Geheimnis), die eine stärkere und länger anhaltende Chemilumineszenz bewirkt. Dieses entstehende Licht kann mittels Röntgenfilm nachgewiesen werden.

Es folgte eine 1-2minütige Inkubation der Nitrozellulosemembran mit einem 1:1-Gemisch der beiden Detektionslösungen. Die bei dieser ablaufenden Reaktion entstandene Lumineszenz wurde anschließend auf enhanced-chemilumineszenzempfindlichen (ECL) Filmen sichtbar gemacht.

Die Blots wurden mit den jeweiligen affinitätsgereinigten Antikörpern anti-sst₁ {9498}, anti-sst₂A {0786}, anti-sst₃ {4823} und anti-sst₅ {0917} in einer Konzentration von 1 µg/ml bei 4 ℃ über Nacht inkubiert.

# 2.6.5. Immunhistochemische Bestimmung von Somatostatinrezeptorsuptypen

Von den bisher bekannten fünf sst-Subtypen wurden in dieser Studie alle außer sst<sub>4</sub> untersucht, da bereits 1995 von Miller et al. aufgrund eigener Erkenntnisse und Literaturrecherchen beschrieben wurde, dass dieser Subtyp nicht in menschlichen Hypophysenadenomen zu detektieren ist (47).

Die Bestimmung der verschiedenen Subtypen erfolgte nach einem Schema, das speziell für die sst-Subtyp-Bestimmung in Magdeburg entwickelt wurde.

Es wurden 7 µm dicke Paraffinscheiben geschnitten und auf Objektträger, für die folgend beschriebene immunhostochemische Untersuchung, aufgebracht.

Dieses Verfahren gliedert sich in einen zweitägigen Ablauf pro Experiment, d. h. pro Rezeptor-Subtyp.

Zur Entfettung / Entparaffinisierung wurden die gefertigten Schnitte 3 x 5 min in Rotihistollösung (Roth) gestellt und anschließend in eine absteigende Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70% jeweils für fünf Minuten) verbracht. Dies diente dazu Wasser in die Zellen der Paraffinschnitte zu bringen, um die Zellkerne nach der Färbung besser identifizieren zu können.

Um eine Bindung der später zugegebenen AK zu ermöglichen, müssen die Zellmembranen semipermeabel gemacht werden. Hierfür erfolgte eine 30minütige Behandlung in einer Lösung aus 250 ml Methanol (J.T. Baker) und 2,5 ml 30% Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird genutzt, um die in den Geweben vorhandene Peroxidase funktionsunfähig zu machen, damit im letzten Reaktionsschritt eine Peroxidase zum Sichtbarmachen der Farbreaktion verwendet werden kann und somit eine spezifischere Bindung dieser Peroxidase ermöglicht wird.

Um Alkoholreste zu entfernen wurden die Objektträger für 10 min in eine Waschlösung, die Trisphosphate buffered saline (TPBS) - Lösung (Tris und NaCl (Roth)), mit einem pH von 7,4 gestellt. Anschließend wurden die Objektträger mit einem 10 mM Citratpuffer, pH 6,0, aus Citronensäure, Natriumcitrat und Aqua dest. mehrmals in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und bei RT abgekühlt.

Damit die später zugefügten AK gut in die Gewebe diffundieren können, wurden die Schnitte dreimal mit je 4minütiger Pause gekocht (8', 4', 4'). Es folgt eine Abkühlphase von etwa 20 min.

Nach erneuter Waschung in TPBS wurden die Objektträger in entsprechende Halterungen eingespannt und um alle Alkohol-, Ionen- und Pufferreste zu entfernen erneut gewaschen.

Eine 1stündige Inkubation bei RT in der feuchten Kammer mit 2 X 200 μl Blocklösung (TPBS, NGS 3%) der Firma Gibco bewirkt eine Besetzung der unspezifischen Bindungsstellen an dem Tumorgewebe und eine bessere folgende AK-Perpermeabilität. In der feuchten Kammer wurden den Schnitten jeweils 2 μl/ml der affinitätsgereinigten Primärantikörper anti-sst<sub>1</sub> (9498), anti-sst<sub>2A</sub> (0786), anti-sst<sub>3</sub> (4823) und anti-sst<sub>5</sub> (0917) in TPBS mit 1% normal goat serum (NGS) zugegeben - je nachdem, welcher sst bestimmt wurde. Eine Bindung erfolgt während einer Inkubation über circa 24h bei 4°C. In diesem Experiment erfolgte die Inkubation immer über Nacht, d.h. über 16-20 Stunden.

Am zweiten Experimentiertag erfolgte primär eine 4malige TPBS-Waschung (à 5 min) um überschüssigen Primär-AK zu entfernen.

200 µl des biotinylierten Sekundärantikörpers der Firma Vector-Laboratories wurden in einer Verdünnung von 1:200 zugegeben und 1 Stunde mit den Objektträgern inkubiert. Die Sekundär-AK, welche direkt an die Primär-AK binden sind am C-terminalen Ende mit Biotin konjugiert, welches für weitere Reaktionskomponenten dient.

Nach erneuter Waschung wurde den Schnitten 200 µl ABC-Elite-Lösung (Linaris) zur Färbung der AK-Kaskade zugegeben. Während der Inkubationszeit von einer Stunde erfolgte durch diesen Komplex, welcher direkt an den Sekundär-AK bindet, eine Signalverstärkung.

Die Abkürzung ABC beschreibt den Meerettichperoxidase konjugierten Avidin-Biotin-Komplex. Die einzelnen Reaktionskomponenten des ABC-Kit sind das Eiweißglykoprotein Avidin (A) und das mit dem Vitamin Biotin (B) konjugierte Enzym Meerettichperoxidase (P). Dreißig Minuten vor Beginn der ABC-Reaktion wurden die bei 4°C aufbewahrten Stammlösungen der Komponenten A und B des "ABC-Elite-Kit" von Vector Laboratories laut Herstellerangaben zusammengefügt, wobei sich drei Moleküle des Meeretichperoxidase konjugierten Biotins mit einem Avidin verbanden. Das Verhältnis der Komponenten war so bestimmt, dass nicht alle Bindungsstellen am Avidin durch Biotin besetzt sind. Während der anschließenden Inkubation der Schnitte in der ABC-Lösung, für eine Stunde bei RT, wurden freie Bindungsstellen des Avidins durch die am sekundären AK gebundenen Biotinmoleküle besetzt.

Zur Antikörper-ABC-Bindungskaskade ist zu ergänzen, dass der primäre Antikörper spezifisch am Antigen bindet, der biotinylierte sekundäre AK erkennt wiederum spezifisch das Fc-Fragment des primären AK. Der Sekundärantikörper war biotinyliertes Ziegen-Anti-Kaninchen IgG. Der Meerettichperoxidase konjugierte Avidin-Biotin-Komplex bindet im letzten Schritt über das Biotin am Sekundärantikörper.

Im Versuchsprotokoll schloss sich nach der Inkubation mit dem sekundären AK ein Waschgang in TPBS an, um nicht gebundene sekundäre Ak aus dem Gewebe zu entfernen. Die Schnitte wurden in Küvetten überführt und die Diaminobenzidin (DAB)-Reaktion zur Gewebefärbung durchgeführt.

Dazu wurden 3 DAB-Tabletten in 60 ml Tris-HCl aufgelöst. Zu dieser Lösung wurden 60 μl Glucose-Oxidase und 600 μl β-D Glucose zugegeben (3,3'-Diamonobenzidin-Glucose-Oxidase). Die mit Folie abgedeckte Küvette wurde 15 min auf dem Schüttler belassen. Grundsätzlich wird bei der DAB-Reaktion durch eine Peroxidase das zunächst farblose Chromogen-3,3'-Diaminobenzidin durch einen Oxidationsprozess in ein bräunliches Produkt umgewandelt, welches zu einer bräunlichen Färbung des Zellgewebes führt.

Nach einer 10minütigen Waschung erfolgt die Hämatoxylin-Färbung um die Zellkerne blau gegen zu färben. Dabei wurden die Objektträger jeweils 30 Sekunden in Hämatoxylin getaucht und anschließend durch Aqua dest. und einer Lösung aus einem 1%igem HCL-Alkohol-Gemisch (150 ml 96% Alc, 1,5 ml 37% HCL) gezogen und mit TPBS gewaschen.

Zur Entwässerung der Gewebe wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 95%, 100%, 100%) jeweils 5 min belassen. Es folgte eine abschließende Entfettung in Rotihistol (Roth) für 2 x 5 min.

Diese beiden zuletzt beschriebenen Schritte dienen zur Säuberung der Gewebe für eine bessere Beurteilung unter dem Mikroskop.

Letzter Schritt des Experiments ist das Eindeckeln der Objektträger mittels DPX-Einschlußmittel (Fluka, Deisenhofen, Deutschland), dem eine letzte Trocknungsphase folgt. Die Objektträger mit der spezifischen Färbung wurden unter dem Mikroskop betrachtet und die Rezeptor-Subtypen bestimmt.

Zur Auswertung der Färbungen nutzten wir das Mikroskop Axiovert 135 von Zeiss mit Immersionsöl (Zeiss) und einer Vergrößerung von 10 x 40 oder 10 x 63.

Um die Bilder zu dokumentieren wurde eine SV Mikro Kamera verwendet. Im Bildbearbeitungsprogramm "Photoshop" wurden die Bilder bearbeitet.

Alle Gewebe wurden von demselben Untersucher beurteilt. Das Vorhandensein oder das Fehlen, sowie die Tiefe der Färbung wurde notiert. Ebenso die Anzahl der Zellen, welche eine positive Farbreaktion zeigten und ob die Färbung an der Plasmamembran lokalisiert war oder eher im Zytosol. Als Auswertungskriterium wurde festgelegt, dass nur jene Tumoren als positiv bezeichnet werden, die eine moderate Färbung streng an die Plasmamembran und / oder das Zytosol in mehr als 50% der Tumorzellen zeigen. Diese Zellen sollen leicht mit einem kleinen Objektiv sichtbar sein. In anderen Fällen, wurden die Tumoren als negativ für den jeweiligen sst-Subtyp bezeichnet.

#### 2.6.6. Kontrollen der Immunhistochemie

Um zu zeigen, dass unser laborchemisches Verfahren spezifisch und sensitiv ist, wurden zum Ausschluss von Kreuzreaktionen zwischen den Rezeptorsubtypen verschiedene Verfahren angewendet.

Immunoblot-Analysen zeigen, dass Kreuzreaktionen ausgeschlossen sind. Für immunhistochemische Kontrollen wurde der Primär-AK weggelassen und durch Preimmun-Serum ersetzt oder es erfolgte eine Adsorption mit verschiedenen Konzentrationen von 1 bis 10 μg/ml homologer oder heterologer Peptide für zwei Stunden bei RT. Normales humanes Pankreas- und Hypophysengewebe wurde in jedem Versuch als Positivkontrolle mitgeführt, da in normalem Pankreasgewebe auch alle sst-Subtypen detektierbar sind. Auch diese wurden mit dem jeweils spezifischen AK beladen und die Verteilung der Rezeptoren an der Membran oder im Zytoplasma kontrolliert.

Westernblot-Analysen, wie oben beschrieben, welche sowohl mit dem Hypophysenadenomgewebe als auch mit normalen Hypophysen durchgeführt wurden, zeigten, dass die Proteine von spezifischen AK erkannt werden und sich jeweils identische Banden für Zellen mit dem gleichen sst-Subtyp am erwarteten Molekulargewicht detektieren lassen.

Die Spezifität der Antiseren wurde mittels immunfluoreszierenden Färbungen von transferierten HEK-293 Zellen überwacht.

Um genauere Angaben über die Spezifität zu erhalten, wurden nach Abschluß der Experimente Peptidgegenfärbungen durchgeführt.

Dabei wurden alle AK mit Antiseren aus homologen und heterologen Antigenpeptiden (6,25-100 µg/ml Antiserum) auf Preadsorption getestet.

Die mitgeführten Gewebe von Pankreasinseln und normalen Hypophysen zeigten die Spezifität der verwendeten AK.

Mit dieser immunhistochemischen Methode wurde schon vielfältig in der Literatur beschrieben, dass die Antiseren effektiv die sst in humanen Brust- und Ovarialtumoren, in Meningeomen, in Karzinoiden, Gastrinomen, Insulinomen und in normalem Pankreasgewebe detektieren (77,78,81).

#### 2.7. Statistik

Die Analyse der Daten erfolgte unter Nutzung der SAS statistical program package (SAS Institute, Cary, NC).

Bei normal verteilten Daten wurden der Mittelwert und die mittlere Standardabweichung (SE) genutzt, andernfalls wurden Mediane (Median, Min, Max) berechnet. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels des Shapiro-Wilks W-Tests überprüft.

Nichtparametrische Statistik wurde mit Hilfe des CHi<sup>2</sup>-Tests kalkuliert. Bei N<7 erfolgte die Analyse mit Hilfe des Fisher Exakt-Tests.

Um Vergleiche zwischen beiden Gruppen zu ziehen, wurde der Mann-Whitney U-Test genutzt. Wenn sich dabei ein Wert kleiner oder gleich 20 ergab wurde der Wert 2 x p, mit p gleich eins minus die kumulative Wahrscheinlichkeit der U-Statistik, kalkuliert. Diese Limitation führt in der Regel zu einer kleinen Unterschätzung der statistischen Signifikanz.

Die Signifikanz von Unterschieden für gepaarte Werte zwischen den beiden Gruppen wurde mittels Wilcoxon's Signed Rank Test ermittelt. Korrelationen erfolgten unter Nutzung des Spearman Rank Tests. Die Signifikanzniveau wurden definiert als p<0,05. Gruppenmittelwerte wurden unter Nutzung des individuellen Wertes, des Mittelwertes oder unter Nutzung des Integralverfahrens "Area under the curve" berechnet.

Die Daten wurden in einer Datenbank auf der Basis von MS Access (2003) kompiliert. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistik-Software STATISTIKA 6.0 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA).

Die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten der präoperativen Therapiegruppe erfolgte nach Aufklärung dieser.

Die Studie wurde unter Beachtung der Kriterien der Deklaration von Helsinki, 1983 überarbeitet, durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde vom Ethik-Komitee des Institutes bewilligt.

## 3. Ergebnisse

# 3.1. GH Suppression

Vor der Darstellung der Ergebnisse soll festgehalten werden, dass für die GH-Bestimmung der Gruppe B1 immer der gleiche Assay verwendet wurde und somit ein direkter Vergleich dieser Patienten möglich war. Für die Patientengruppe B2 wurde ein anderer Assay verwendet, so dass man lediglich Prozente und keine absoluten Werte dieser beiden Teilkollektive angeben und vergleichen kann.

Für die Diagnosestellung und die Beurteilung des Therapieerfolges wurde das als Standard anerkannte und im Konsensusbericht von Guistina et al. 2000 niedergeschriebene Kriterium des GH-Nadirs <1,0 µg/l im oGTT verwendet (26).

Durch die medikamentöse Behandlung mit Octreotid fiel die GH-Konzentration vor chirurgischer Tumorextirpation bei allen Patienten ab.

Vor der medikamentösen Therapie lag der Median der GH-Konzentration für die Gruppen B1 und B2 bei 32,4  $\mu$ g/l (3,7/ 127,9  $\mu$ g/l) und 27,4  $\mu$ g/l (7,3 / 92,3  $\mu$ g/l).

Unter Therapie konnte eine Reduktion der GH-Konzentration auf einen Median von 6,1  $\mu$ g/l (0,7 / 33  $\mu$ g/l) und 4,3  $\mu$ g/l (1,27 / 15,8  $\mu$ g/l) gezeigt werden.

Diese Daten sind in Tabelle 6.2 im Anhang veranschaulicht.

Eine signifikante Reduktion, p<0,05, der GH-Konzentration zeigte sich, aus Tabelle 3.1.1 zu entnehmen, bei  $67,6\% \pm 5,8\%$  (n=20).

**Tab.3.1.1:** Somatostatin-Rezeptor-Subtypen-Status und Octreotid-Suppression

Hypophysenadenome	Tumor-	GH	Somatostatin-			
nach:	wachstum	Suppression	Rezeptor-Status (%)			s (%)
	(%)	(%)	sst1	sst2	sst3	sst5
Primärer Tumorresektion (n=12)	-	-	83	100	25	92
Langzeit-Oct-Therapie (n=20)	-31,5	67,6	84	65	21	85
Responder (n=14)	-35,5	81,3	85	93	23	93
Partial/Non-Responder (n=6)	-22,2	35,7	83	0	17	67

Bei den 14 Patienten der Therapiegruppe, welche per oben genannter Definition als Responder, mit einem GH-Abfall von mehr als 50%, eingestuft wurden, lies sich das GH um -81%  $\pm$  3,6% supprimieren, während bei den sechs GHNR lediglich ein Abfall um 35,7%  $\pm$  7,1% zu verzeichnen war (Tab. 3.1.1 und 3.1.2).

Der GH-Abfall war signifikant höher bei den GHR im Vergleich zu den GHNR (p<0,0001).

GHR und GHNR waren nicht signifikant verschieden im Hinblick auf Alter, Geschlecht, Dauer der Oct-Therapie, GH-Konzentration basal und nach SSA-Therapie, Prozente der Tumorvolumenreduktion oder die Anzahl der Volumenresponder.

In dieser Studie waren alle GHNR negativ für  $sst_{2A}$ , während 13 der 14 GHR positiv für diesen sst-Subtyp waren (p<0,0001).

Die GH-Response auf Oct korreliert mit der Expression von sst<sub>2A</sub> (p=0,002).

Keiner der anderen Parameter, z.B. die GH-Konzentration vor oder während der Oct-Therapie, die Dauer dieser Therapie oder die Volumenansprache korrelierten mit der Expression von sst<sub>2A</sub>. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen GHR und GHNR für das Vorhandensein von sst<sub>1</sub>, sst<sub>2A</sub>, sst<sub>3</sub> oder sst<sub>5</sub> demonstriert werden.

Die Medianwerte des GH bei den 14 R fielen in unseren Untersuchungen signifikant, mit einem p kleiner 0,001, auf 19% der basalen Konzentrationen.

Der basale Median des GH-Profils aller R lag bei 48,1  $\mu$ g/l (3,7-127,9  $\mu$ g/l). Nach der Therapie mit Oct zeigte sich eine GH-Konzentration der R im Profil von 4,1 (0,7 / 30,9)  $\mu$ g/l, siehe hierzu Tabelle 3.1.2.

**Tabelle 3.1.2:** GH-Konzentrationen für Gruppe B im Studienverlauf

	GH basal	GH nach Therapie	GH-Abfall	GH-Abfall	p-Wert
	(µg/l)	(µg/l)	(µg/l)	(%)	
Responder	51,7 (3,7 / 27,9)	7,4 (0,9 / 30,9)	44,3	81,3	p<0,001
Non-					
Responder	21,3 (8,4 / 37,8)	14,5 (4,3 / 33,0)	6,9	35,7	p>0,043

Die Angaben erfolgen als Median (Min / Max). Die p-Werte sind für den Verlauf angegeben.

Die Abbildung 3.1.1 zeigt den individuellen Abfall der GH-Konzentration im Profil der 20 Patienten aus Gruppe B:

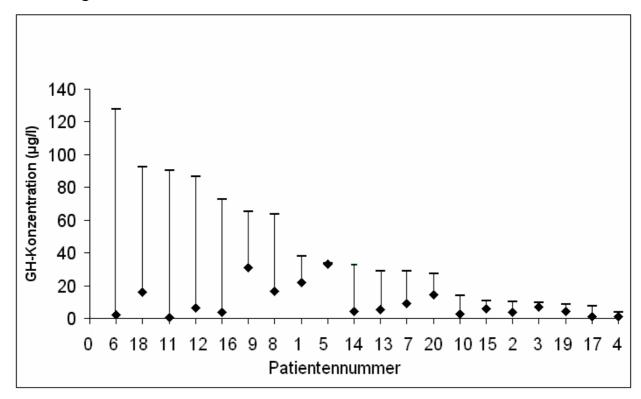


Abbildung 3.1.1: individuelle Mittelwerte des GH-Profils

Abfall der GH-Werte nach Oct-Therapie, gezeigt sind die MW im GH-Profil, n=20

— Basalwert → nach Oct-Therapie

Ausführliche Daten zu den GH-Konzentrationen und zum GH-Abfall des Einzelpatienten sind in Tabelle 6.2 im Anhang wider gegeben.

#### 3.2. Tumorvolumenreduktion

Insgesamt war in der vortherapierten Gruppe eine Volumenminderung von -31,5% anhand der MRT-Auswertungen ermittelbar.

Ein Tumorvolumenabfall von mehr als 20% war bei 12/20 Patienten ersichtlich, während 8 Patienten als Tumorvolumen-Non-Responder klassifiziert wurden.

Ebenfalls aus Tabelle 3.1.1 ersichtlich, fiel bei den 12 R das TV signifikant um 35,5%, bei den NR lediglich um 22,2%. Bei diesen Patienten korreliert die GHR positiv mit sst<sub>2</sub>. Bei der Berechnung ergab sich ein Chi<sup>2</sup>-Test von 15.9 und ein p<0,0002.

Der größte Tumorvolumenabfall wurde mit -91% bei einem 25 jährigen männlichen Patienten erreicht.

In unserer Studie war unter der SSA-Therapie auch eine Tumorvolumenzunahme von +1% und +19% zu verzeichnen. Es handelte sich dabei um zwei weibliche Patienten (Tabelle 6.3).

Bei den acht Männern der Gruppe B zeigte sich im Mittel ein größerer TV-Abfall als bei den 12 Frauen (50% versus 23%).

Der Volumenabfall war signifikant höher bei den TVR im Vergleich zu den TVNR. Von den 12 R betrug die TVR im Mittel -49,7  $\pm$  6,9%, bei den acht TVNR betrug sie -4,3  $\pm$  3,9%, mit einem p<0,0001.

Volumenresponder und TVNR waren nicht signifikant verschieden in Bezug auf Alter, Geschlecht, Tumorgröße vor Therapie, Dauer der Oct-Therapie, Prozent der GH-Reduktion oder der Anzahl der GH-Responder.

Hingegen waren diese Tumore signifikant verschieden in der Expression des sst<sub>3</sub>. Bei allen Patienten, welche eine signifikante TVR zeigten, konnte sst<sub>3</sub> nicht nachgewiesen werden (TVR: sst<sub>3</sub> 0/12), während 50% der Patienten ohne TVR Positivität für die Färbung des sst<sub>3</sub> zeigten (TVNR: sst<sub>3</sub> 4/8).

Die Expression dieses Subtyps war negativ korreliert mit der TVR auf Oct, mit einem p<0,02.

Keiner der anderen Parameter, z.B. die Wachstumshormonansprache auf Oct, die Dauer der Therapie oder das Volumen vor der Therapie korrelierten mit der Expression von sst<sub>3</sub>. Es konnten keine signifikanten Unterschiede für das Vorhandensein von sst<sub>1</sub>, sst<sub>2A</sub> oder sst<sub>5</sub> in Bezug auf TVR versus TVNR demonstriert werden.

## 3.3. IGF-1-Werte

Der Median der IGF-1-Konzentration von Gruppe B1 lag vor der Octreotidtherapie bei 1749,63 (386/11167,7) µg/l.

Der Median des IGF-1 zur letzten Messung vor chirurgischer Tumorextirpation betrug 589,84 (124,3/ 1135,3)  $\mu$ g/l. Postoperativ war ein Abfall der IGF-1-Konzentration um 71,44% des Basalwertes auf einen Median von 499,62 (79,7/ 1591,3)  $\mu$ g/l zu verzeichnen.

Alters- und geschlechtsentsprechende Normwerte für die IGF-1-Konzentration zeigten sich während der präoperativen Oct-Therapie lediglich bei drei der 20 Personen (Tabelle 6.3). Ermittelt wurde diese mit Hilfe der Tabelle 2.4.1.

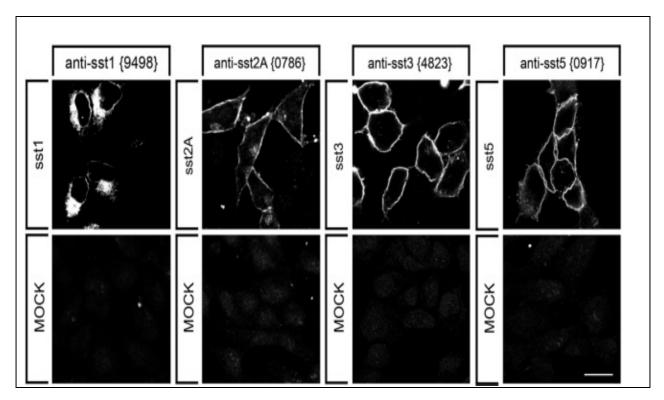
Weder die basale IGF-1-, noch die IGF-1-Konzentration während Octreotid-Therapie, der prozentuale Abfall des IGF-1 oder die qualitative Normalisierung der IGF-1-Konzentration korrelierten mit der sst-Rezeptor-Expression.

Die IGF-1-Werte fielen bei den 11 R, im Mittel um 1397,9 ( $\pm$ 122,0/  $\pm$ 11043,4)  $\pm$ 1. Bei den vier zu ermittelnden NR zeigte sich ein Abfall von 492,8 ( $\pm$ 108,6/  $\pm$ 1694,0)  $\pm$ 1.

## 3.4. Charakterisierung der Somatostatin-Rezeptor-Antikörper

Die Spezifität der Antiseren wurde unter Nutzung der Immunfluoreszenz an transferierten HEK-293-Zellen überwacht. Nach Färbung dieser Zellen mit den AK antisst<sub>1</sub> {9498}, anti-sst<sub>2A</sub> {0786}, anti-sst<sub>3</sub> {4823} oder anti-sst<sub>5</sub> {0917} wurde eine prominente Immunfluoreszenz nur in jenen Zellen detektiert, welche den jeweiligen Rezeptor exprimierten. Wie die Abbildung 3.4.1 zeigt, erfolgte keine Detektion, wenn Zellen mit anderen Somatostatin-Rezeptoren oder leeren Vektoren transferiert wurden.

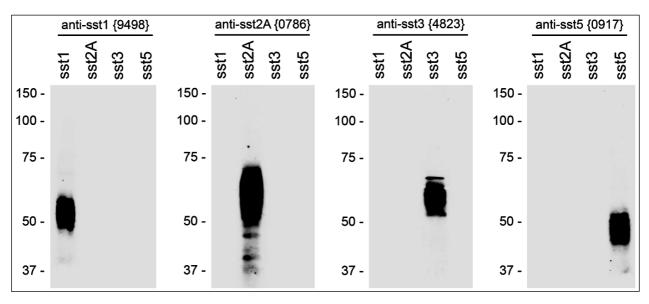
**Abbildung 3.4.1:** Charakterisierung der Anti-Somatostatin-Rezeptor-Antiseren mittels Immunfluoreszenzfärbung von transferrierten Zellen



HEK-293-Zellen wurden mit  $sst_1$ ,  $sst_{2A}$ ,  $sst_3$ ,  $sst_5$  oder leerem Vektor (MOCK) transferiert (vertikale Kolumnen), fixiert und mit anti- $sst_1$  {9498}, anti- $sst_{2A}$  {0786} anti- $sst_3$  {4823} oder anti- $sst_5$  {0917} Antiseren (horizontale Kolumnen) gefärbt. Darauf hingewiesen sei, dass Somatostatin-Rezeptor-AK nur transferierte Zellen mit dem jeweils spezifischen Rezeptor färben, aber keine Zellen, welche mit leerem Vektor transferiert wurden. Skaleneinteilung 10  $\mu$ m.

Die Somatostatin-Antiseren wurden auf positive Kreuzreaktion mit anderen Proteinen aus humanen HEK-293-Zellen getestet. Die Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 3.4.2, zeigen, dass Somatostatin-Rezeptor-AK anti-sst<sub>1</sub> {9498}, anti-sst<sub>2A</sub> {0786}, anti-sst<sub>3</sub> {4823} und anti-sst<sub>5</sub> {0917} breite Banden am erwarteten Molekulargewicht nur in jenen Zellen detektieren, welche den verwendeten Rezeptor exprimieren. Keine Detektion erfolgte in Zellen, welche mit anderen sst-Subtypen transferiert wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass sst-Rezeptor-AK selektiv ihren Rezeptor detektieren und keine Kreuzreaktion zeigen.

**Abbildung 3.4.2:** Western-Blot-Analysen für die Spezifität der Somatostatin-Rezeptor-Antiseren



Membranpräparationen von HEK-293-Zellen, welche sst<sub>1</sub>, sst<sub>2</sub>A, sst<sub>3</sub> oder sst<sub>5</sub> exprimieren, wurden getrennt in 8% SDS-Polyacrylamid-Gel gebracht und auf Nitrozellulosemembranen geblottet. Diese Membranen wurden mit anti-sst<sub>1</sub> {9498}, anti-sst<sub>2</sub>A {0786} anti-sst<sub>3</sub> {4823} oder anti-sst<sub>5</sub> {0917} Antiseren mit einer Verdünnung von 1:20000 inkubiert. Die Entwicklung der Blots erfolgte unter Nutzung der Chemilumineszens. Ordinate: Migration der markierten Proteinmolekulargewichte ( $M_r \times 10^{-3}$ )

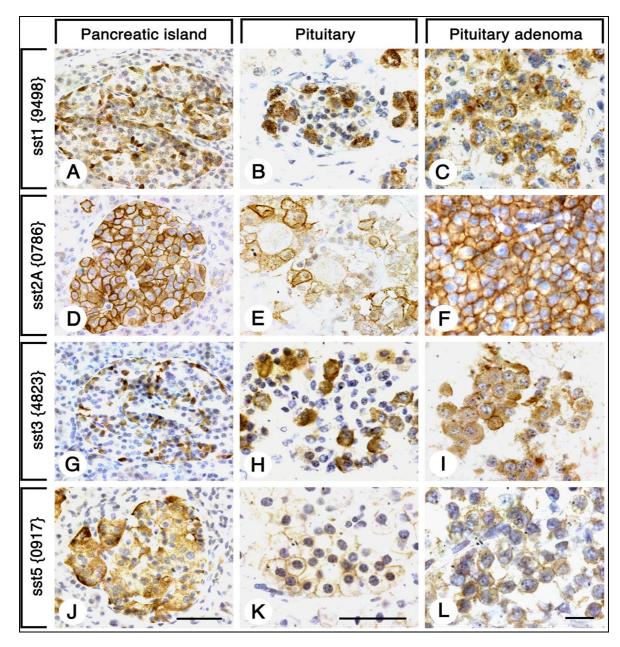
Die anti-sst<sub>1</sub> {9498}, anti-sst<sub>2A</sub> {0786}, anti-sst<sub>3</sub> {4823} oder anti-sst<sub>5</sub> {0917} AK wurden anschließend zur immunhistochemischen Färbung von normalem menschlichen Pankreasgewebe und Hypophysengewebe genutzt.

Wie in Abbildung 3.4.3 gezeigt, produziert jeder der AK verschiedene Färbemuster in Pankreas- und Hypophysenzellen. Anhand des von uns gewonnenen Bildes kann man die zelluläre Lokalisation der Rezeptor-Subtypen darstellen.

Sst<sub>2</sub> ist als einziger der vier untersuchten, in Hypophysenadenomen detektierbaren Subtypen membranständig nachweisbar. Die bräunliche Färbung durch die Diaminobenzidin-Glucose-Oxidase zeigt die Verteilung an den Zellmembranen.

Während sst<sub>2A</sub> und sst<sub>5</sub> predominant in der Plasmamembran von fast allen Pankreasinselzellen lokalisiert sind, konnten sst<sub>1</sub> und sst<sub>3</sub> deutlich im Zytosol der Zellen und nur vereinzelt als punktartige Färbung in der Plasmamembran detektiert werden. Ähnliche Färbemuster konnten in normalen Hypophysengeweben gefunden werden.

**Abbildung 3.4.3:** Immunhistochemische Färbung der Somatostatin-Rezeptor-Subtypen in human Pankreasgewebe, Hypophysen und GHsezernierenden Hypophysenadenomen



Repräsentative Beispiele der immunhistochemischen Detektion von sst1 (C), sst2A (F), sst3 (I) und sst5 (L) in somatotrophen Hypophysenadenomen. Pankreas- und Hypophysengewebe, welches in jeder Färbung als Positivkontrolle mitgeführt wurde, zeigen die Färbungen für sst1 (A und B), sst2A (D und E), sst3 (G und H) und sst5 (J und K).

Die Gewebe wurden zunächst entfettet, in der Mikrowelle in Zitronensäure gekocht und mit affinitätsgereinigten anti-sst $_1$  {9498}, anti-sst $_2$ A {0786} anti-sst $_3$ , {4823} oder anti-sst $_5$  {0917} AK in einer Konzentration von 2 µg/ml inkubiert. Es folgte eine sequentielle Behandlung mit biotinylierten Anti-Hasen IgG und AB-Lösung, bevor die Gewebe mit DAB-Glucose-Oxidase und Hämatoxylin gefärbt wurden. Darauf hingewiesen sei, dass sst $_1$  und sst $_2$ A predominant an der Plasmamembran lokalisiert sind, während sst $_1$  und sst $_3$  deutlich im Zytosol der Zellen und nur vereinzelt als punktartige Färbung in der Plasmamembran detektiert werden konnten.

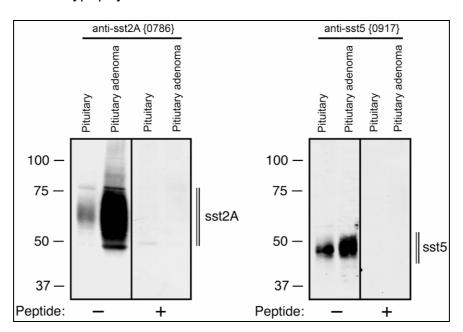
Skaleneinteilung:  $A=D=G=J=100 \mu m$ ,  $B=E=H=K=50 \mu m$ ,  $C=F=I=L=20 \mu m$ .

Um genauere Angaben über die Spezifität zu erhalten, wurden nach Abschluß der Experimente Peptidgegenfärbungen durchgeführt.

Dabei wurden alle AK mit Antiseren aus homologen und heterologen Antigenpeptiden  $(6,25\text{-}100~\mu\text{g/ml}$  Antiserum) auf Präadsorption getestet. Eine Präadsorption der Antiseren mit homologen Antigenen einer Konzentration geringer als  $6,25~\mu\text{g/ml}$  blockt komplett die Immunadsorption im Pankreas- und Tumorgewebe. Wie in Abbildung 3.4.4 ersichtlich, konnte während einer Präadsorption der Antiseren mit heterologen Antigenen einer Konzentration über  $10~\mu\text{g/ml}$ , kein Effekt auf die Immunfärbung gezeigt werden.

Die Gewebe wurden elektrophoretisch separiert und auf Nitrozellulose geblottet. Anhand der Rezeptoren 2A und 5 wurde gezeigt, dass die Antiseren breite rezeptorähnliche Banden mit einem Molekulargewicht zeigen, welches ähnlich für rekombinante sst beobachtet wurde. Anhand der Abbildung 3.4.4 ist ersichtlich, dass speziell für den anti-sst<sub>2A</sub> AK {0786} eine breite Migrationsbande von M<sub>r</sub> 55.000 zu 75.000 und für den anti-sst<sub>5</sub> AK {0917} eine Wanderung von M<sub>r</sub> 45.000 bis 55.000 detektiert wurde.

**Abbildung 3.4.4:** Western-Blot-Analysen: Überexpression von sst<sub>2</sub> und sst<sub>5</sub> in Hypophysenadenomen



Membranpräparationen von humanen Hypophysen und GH-sezernierenden Adenomen wurden getrennt in 8% SDS-Polyacrylamid-Gel gebracht, auf Nitrozellulosemembranen geblottet und mit anti-sst<sub>2A</sub> {0786} oder anti-sst<sub>5</sub> {0917} AK in An- (+) oder Abwesenheit (-) von 10 g/ml Peptidantigen inkubiert. Die Blots wurden unter Nutzung der Chemilumineszenz entwickelt.

Ordinate: Migration der markierten Proteinmolekulargewichte (M<sub>r</sub> x 10<sup>-3</sup>)

In Membranpräparationen von GH-sezernierenden Adenomen wurden beträchtlich stärkere immunoreaktive Banden für beide Rezeptor-Subtypen, wandernd bei ähnlichen Molekulargewichten, detektiert. Darauf hingewiesen sei, dass diese beiden Rezeptoren in GH-sezernierenden Adenomen überexprimiert werden.

# 3.5. Somatostatin-Rezeptor-Subtypen-Verteilung

Mit subtypspezifischen AK gegen sst<sub>1</sub>, sst<sub>2A</sub>, sst<sub>3</sub> und sst<sub>5</sub> wurde deren spezifische Verteilung, ihre zelluläre Lokalisation und die individuelle Expression in Hypophysen-adenomen systematisch mit der standardisierten Avidin-Biotin-Komplex-Methode immunhistochemisch auf Proteinebene analysiert.

Waren mindestens 20% der Zellen auf dem Objektträger immunoreaktiv für den jeweiligen sst-Subtyp, dann wurden diese Patienten als rezeptorpositiv bezeichnet.

Die Patienten beider Studiengruppen waren hinsichtlich Alter und Geschlecht vergleichbar. In Gruppe A befanden sich im Vergleich zu Gruppe B mehr MI, die Verteilung der sst-Subtypen war bei MI und MA gleich (Tabelle 6.1 und 6.2 im Anhang).

Anhand Tabelle 3.1.1 ist ersichtlich, dass in der Kontrollgruppe, bei 12/14 (86%) sst<sub>1</sub>, bei lediglich 4/14 (29%) sst<sub>3</sub> und bei 13/14 (93%) sst<sub>5</sub> nachweisbar war.

Es konnte bei allen primär chirurgisch therapierten Patienten, welche nie einer anderen Therapie im Vorfeld unterzogen wurden, sst<sub>2A</sub> nachgewiesen werden (14/14).

Die korrespondierenden Daten in Gruppe B waren für  $sst_1$  16/19 (84%) Tumore – bei einem Schnitt konnte keine Aussage getroffen werden, da sich nach der Färbung zu wenig Gewebe auf dem Objektträger befand um genügend Zellmaterial aus zu zählen. 13/20 (65%) Tumore waren für  $sst_{2A}$  positiv, vier von 19 (21%) für  $sst_3$  und 17 der 20 (85%) Tumore für  $sst_5$ .

Die Verteilung der sst-Subtypen in beiden Studiengruppen ist in der Abbildung 3.5.1 graphisch dargestellt. Beide Studiengruppen unterschieden sich signifikant, mit einem p von 0,014, in der Expression des Rezeptor-Subtyps-2A.

Weder die Tumorklassifikation (MI / MA), noch das Alter oder Geschlecht konnten mit der Expression von sst<sub>1</sub>, sst<sub>2A</sub>, sst<sub>3</sub> oder sst<sub>5</sub> in Verbindung gebracht werden.

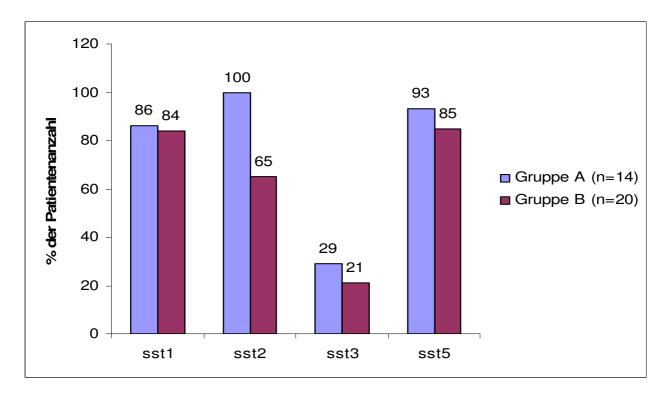


Abbildung 3.5.1: Rezeptor-Subtyp-Nachweis in beiden Studiengruppen

Anzahl der Patienten mit dem jeweiligen Somatostatin-Rezeptor in Gruppe A und B

# 3.5.1. GH-Response

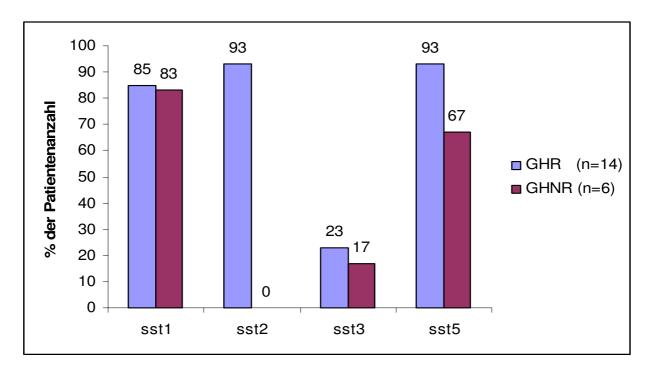
Anhand der Einteilung zwischen R und NR in Bezug auf die GH-Konzentration, nach obiger Definition, waren folgende Daten zu ermitteln:

In Gruppe B sind 85% der R positiv für sst<sub>1</sub>, aber auch 83% aller NR weisen sst<sub>1</sub> auf.

Sst<sub>2A</sub> wurde bei keinem NR nachgewiesen. Diese Daten sind in der Abbildung 3.5.1.1 verdeutlicht.

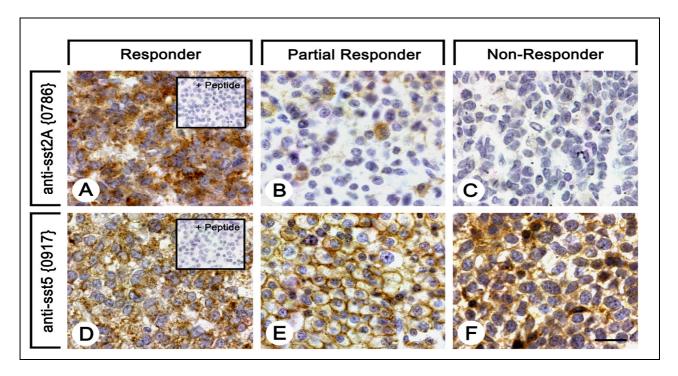
Die Abbildungen 3.5.1.1 und 3.5.1.2 zeigen den selektiven Verlust der Expression von sst<sub>2</sub> bei Oct-resistenten GHNR. Bei allen GHR war sst<sub>2</sub> in hoher Dichte membranständig zu finden.

Abbildung 3.5.1.1: Rezeptorsubtypverteilung bei GHR vs GHNR



GHR und GHNR weisen unterschiedliche Rezeptor-Verteilungen auf. Es zeigt sich ein selektiver Verlust des  $sst_2$  bei GHNR und eine Koexpression von  $sst_2$  und  $sst_5$  bei allen GHR.

Abbildung 3.5.1.2: selektiver Verlust des sst<sub>2</sub> bei GHNR und Octreotid-Therapie



Immunhistochemische Färbung der sst in Hypophysengewebe mit mehr als oder weniger als 50% Abfall der GH-Konzentration in Bezug auf die Oct-Therapie (GHR und GHNR). Die immunhistochemischen Färbungen von sst $_{2A}$  und sst $_{5}$  sind prädominant an der Plasmamembran lokalisiert. Bei Patienten, welche nicht auf die Oct-Therapie ansprachen konnte keine Färbung des sst $_{2A}$  detektiert werden. Einfügungen in A und D: Peptid-Adsorptions-Kontrollen: komplette Aufhebung der immunhisto-chemischen Färbung durch Präinkubation mit dem Antigen-Peptid (10µg/ml). Die Gewebe wurden zunächst entfettet, in der Mikrowelle in Zitronensäure gekocht und mit affinitätsgereinigten anti-sst $_{2A}$  {0786} oder anti-sst $_{5}$  {0917} AK in einer Konzentration von 2 µg/ml inkubiert. Es folgte eine sequentielle Behandlung mit biotinylierten Anti-Hasen IgG und AB-Lösung, bevor die Gewebe mit DAB-Glucose-Oxidase und Hämatoxylin gefärbt wurden. Darauf hingewiesen sei, dass bei NR nur sst $_{5}$  und kein sst $_{2A}$  detektierbar war. Skaleneinteilung:  $A=B=C=D=E=F=20~\mu m$ .

Bei sst<sub>3</sub> konnte kein signifikanter Unterschied zwischen R und NR in Bezug auf den Rezeptor-Status nachgewiesen werden.

Ein größerer Unterschied war bei sst<sub>5</sub> zu verzeichnen. Hier fand sich bei 13 von 14 (93%) R und bei 4 von 6 (67%) NR eine Immunopositivität.

Der im folgendem beschriebene Zusammenhang zwischen dem Rezeptor-Status, der GHR und der GHNR ist in Tabelle 3.5.1 verdeutlicht.

**Tabelle 3.5.1:** sst-Status und GHR oder VR bei Patienten mit Akromegalie und präoperativer Oct-Therapie

	sst1		sst2		sst3		sst5	
	pos	neg	pos	neg	pos	neg	pos	neg
	(n=16)	(n=3)	(n=13)	(n=7)	(n=4)	(n=15)	(n=17)	(n=3)
GHR	11	2	13	1	3	10	13	1
GHNR	5	1	0	6	1	5	4	2
TVR	9	2	8	4	4	11	10	2
TVNR	7	1	5	3	0	4	7	1

Alle GHR weisen sst<sub>2</sub> auf, während kein GHNR diesen Rezeptor besitzt. 73% der Patienten mit negativem sst<sub>3</sub> zeigen eine TVR.

Bei dem Rezeptor-Subtyp 1 fanden wir sowohl GHR als auch GHNR in annähernd gleichen Prozentsätzen. Der Chi<sup>2</sup>-Test ergab eine Wert von 0,005, mit einem p<0,94.

Eine sehr gute Übereinstimmung mit der GHR zeigte sst<sub>2</sub>.

Hier wiesen 13 der 14 GHR diesen Rezeptor auf, was in der Abbildung 3.5.1.3 ersichtlich ist.

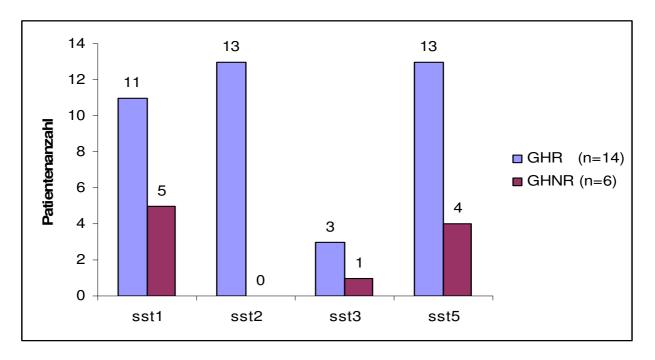
Dies zeigt eine hochsignifikante Korrelation zwischen dem Auftreten von sst<sub>2</sub> und ein Ansprechen auf die SSA-Therapie mit einem GH-Abfall.

100 % aller GHNR unserer Untersuchung waren negativ für sst<sub>2</sub>.

Im Chi<sup>2</sup>-Test ergab sich für diesen Rezeptor-Subtyp ein Wert von 15,9 mit einem p<0,002. Dieses hoch signifikante Ergebnis zeigt, dass bei positivem sst<sub>2</sub> mit einer besseren GHR zu rechnen ist.

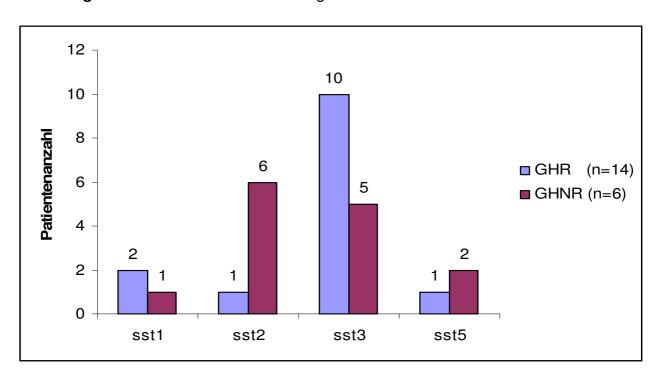
Veranschaulicht sind diese Aussagen in den Abbildungen 3.5.1.3 und 3.5.1.4.

Abbildung 3.5.1.3: GHR vs. GHNR bei positivem SSTR



Alle Patienten mit positivem sst<sub>3</sub> wurden vor der medikamentösen Therapie als GHR definiert. n=20

Abbildung 3.5.1.4: GHR vs. GHNR bei negativem SSTR



Es ist keine Signifikanz bei negativem Rezeptor-Status und GHR erkennbar. n=20

Bei Rezeptor-Subtyp 3 ist anhand der nicht signifikanten Ergebnisse keine eindeutige Korrelation in Bezug auf die Senkung der GH-Konzentration zu erkennen.

Bei der Berechnung unter Nutzung der 4-Felder-Tafel ergab sich im Chi<sup>2</sup>-Test ein Wert von 0,1 mit einem p<0,75. Mittels des Fisher-exakten-Tests erhielten wir einen Wert von 0,096.

Für sst<sub>5</sub> ergibt sich ein Chi<sup>2</sup>-Test von 2,26 mit einem p<0,13 und einem Fisher-exakten-Test von 2,15. Dies beweist keine Signifikanz.

Beim sst<sub>5</sub> zeigten sich in unseren Untersuchungen annähernd gleiche Werte des GH-Abfalls bei positivem und negativem Rezeptor Status, ähnlich wie auch beim Nachweis des sst<sub>1</sub>.

# 3.5.2. Tumorvolumen (TV)-Reduktion

Anhand der Tumorvolumenabnahme und des nachgewiesenen Rezeptorstatus konnten folgende Ergebnisse für Gruppe B aus Tab.3.5.1 ermittelt werden:

Die nicht signifikanten Ergebnisse mit einem Chi<sup>2</sup>-Test von 3,2 und einem p<0,07, lassen keine Korrelation zwischen sst<sub>1</sub> und TVR zu.

Positiv für sst<sub>2</sub> waren 13 Tumore. Nach der SSA-Therapie zeigte sich bei acht Tumoren eine TVR, fünf zeigten anhand der magnetresonanztomographischen Aufnahmen keine Volumenminderung.

Bei vier der sieben sst<sub>2</sub>-negativen Tumore (57%) fanden wir eine TVR, bei den restlichen drei (42,9%) zeigte sich keine TVR. Der Chi<sup>2</sup>-Test ergab 0,04, mit einem p<0,8, auch hier zeigt sich keine positive Korrelation mit der TVR.

Überraschende Ergebnisse in Bezug auf die TVR fanden wir in unserer Studie bei sst<sub>3</sub>. Hier reagierten von 15 sst<sub>3</sub>-negativen Fällen 11 (73,3%) mit einer deutlichen Volumenabnahme. Keine TVR zeigten lediglich vier der 15 Patienten ohne sst<sub>3</sub>. Alle vier Adenome mit positivem sst<sub>3</sub> zeigten eine TVR.

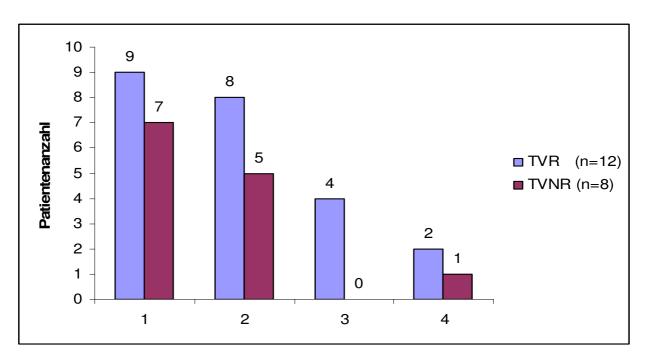
Mit einem Chi<sup>2</sup>-Test von 1,35 und einem p<0,2 bedeutet dies, dass keine Korrelation in unserer Studie zwischen dem Nachweis eines positiven sst<sub>3</sub>-Status und der Tumorvolumenabnahme besteht.

Beim sst<sub>5</sub> wiesen Rezeptorpositive und Rezeptornegative in annähernd gleichem Verhältnis eine TVR auf.

Auch hier kann nicht abschließend beurteilt werden, ob positiver oder negativer Rezeptor-Status für eine TVR ausschlaggebend ist ( $Chi^2$ -Test = 4,2, p<0,04).

Die unterschiedliche Verteilung der Rezeptor-Subtypen bei den R und bei den NR mit der jeweiligen Tumorvolumenreduktion zeigen die folgenden Abbildungen 3.5.2.1 und 3.5.2.2.

Abbildung 3.5.2.1: TVR vs. TVNR bei positivem SSTR



Es zeigt sich keine Signifikanz in Bezug auf Rezeptor-Status und TVR. n=20

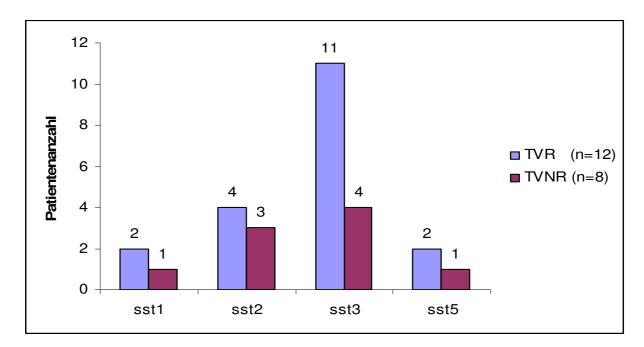


Abbildung 3.5.2.2: TVR vs. TVNR bei negativem SSTR

Die meisten Patienten mit TVR weisen keinen sst<sub>3</sub> auf. n=20

Zusammenfassend ist bei der Rezeptor-Subtyp-Bestimmung festzustellen, dass  $sst_2$  in allen und  $sst_5$  in fast allen primär operierten Tumoren nachgewiesen werden konnte. Eine ähnlich hohe Inzidenz der beiden genannten sst-Subtypen fand sich in unserer Untersuchung bei den vierzehn als R definierten Personen der primär medikamentös therapierten Gruppe.

Bei diesen 14 R zeigte sich auch ein signifikanter GH-Abfall, welcher mit dem Vorhandensein des  $sst_2$  korreliert. Der basale Median dieser Patienten lag bei 48,1 (3,7 / 127,9)  $\mu$ g/l und während der Oct-Therapie bei 4,1 (0,7 / 30,9)  $\mu$ g/l mit einem signifikantem p<0,001.

Keiner der Patienten, die als NR deklariert wurden wies in dieser Studie einen detektablen sst<sub>2</sub> auf, während sich bei 17/20 dieser NR ein positiver sst<sub>5</sub> nachweisen lies. Die GHR korreliert in dieser Untersuchung nicht mit einer sst<sub>5</sub>-Expression.

Eine signifikante Tumorvolumenabnahme fanden wir bei 12 der 20 Patienten, wobei 11 dieser Patienten (91,7%) negativ für sst<sub>3</sub> waren.

Bei diesen TVR korreliert zusätzlich die GHR positiv mit dem Vorhandensein des sst<sub>2</sub>. Im Chi<sup>2</sup>-Test ergab sich ein signifikantes Ergebnis von 15,9 bei einem p<0,0002.

Ein signifikanter Tumorvolumenabfall korreliert in unseren Untersuchungen weder mit dem  $sst_1$  noch mit dem  $sst_5$ .

## 4.Diskussion

Das zyklische Peptid SS, welches aus 14 AS besteht, entfaltet seine Wirkung über spezifische Membranrezeptoren, welche in zahlreichen Geweben einschließlich des HVL und anderen Gehirnregionen, der Lunge, des endo- und exokrinen Pankreas, der Mukosa des Gastrointestinaltraktes wie auch in Lympho- und Monozyten zu finden sind. Bisher wurden fünf Typen von Somatostatinrezeptoren identifiziert (43,44), welche auch auf neuroendokrinen Tumoren und in der Hypophyse exprimiert werden (40).

Das natürliche Somatostatin und die SSA unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität zu den einzelnen Rezeptor-Subtypen. SS bindet an allen fünf Rezeptoren mit gleich hoher Affinität, während die SSA Lanreotid (Somatuline®) und Sandostatin (Octreotid®) vornehmlich am sst<sub>2</sub> koppeln (82,83).

Die gute Wirksamkeit dieser Pharmaka ist dadurch zu erklären, dass die meisten Hypophysenadenome sst<sub>2</sub> exprimieren, wie in zahlreichen Studien untersucht, mehrfach in der Literatur beschrieben und auch in dieser Studie auf Proteinebene gezeigt wurde (49,84-86).

Anhand der Ergebnisse von bisherigen abgeschlossenen klinischen Studien würde man prinzipiell erwarten, dass die GH-Senkung positiv mit dem sst-Status korreliert.

Die Szintigraphie der Somatostatin-Rezeptoren zeigt jedoch, wie in einer Studie von Plöckinger et al. 1997 an 49 Patienten und 3-monatiger Oct-Therapie untersucht wurde, keine eindeutige Signifikanz einer Oct-Therapie bezüglich der Vorhersage der GH- und TV-Ansprache (87).

Diese Autoren schlossen 25 Patienten mit GH-sezernierenden Adenomen und 24 Patienten mit NFA in die Studie ein. Vier und 24 Stunden nach der  $^{111}$ In-Pentetreotide-Injektion wurden SPECT-Aufnahmen angefertigt. Die Szintigraphie konnte bei keinem der sieben magnetresonaztomographisch adenomnegativen Patienten mit persistierender postoperativer Akromegalie einen Resttumor identifizieren. Die basale GH- und die IGF-1-Konzentration korrelierte nicht mit den szintigraphischen Ergebnissen (GH:32,3 ± 18,2 vs 29,3±7,4 µg/l, IGF-1: 851 ± 80 vs 1038 ± 153 µg/l). Die Szintigraphie konnte in keiner der beiden Therapiegruppen den Effekt einer Oct-Therapie auf die TV-Reduktion oder die Senkung der GH-Konzentration präzise vorhersagen.

Acosta-Gómez et al. führten 2005 die <sup>111</sup>In-Octreotide-Szintigraphie an 29 Patienten durch (88). Die Untersuchungsgruppen bestanden zum einen aus 14 Patienten mit nachgewiesenen Hypophysenadenomen und zum anderen aus 15 Patienten mit wieder aufgetretenen Adenomen. An 10 der 14 Patienten mit Hypophysenadenomen und an 13 der 15 Patienten mit Rezidivadenomen konnte eine positive Szintigraphie mit einer Sensitivität von 79% nachgewiesen werden. Bessere Ergebnisse wurden mit dieser Methode bei GH-sezernierenden Adenomen und bei Prolaktinomen erzielt. Von welcher Bedingung jedoch ein Ansprechen auf die SSA-Therapie abhängt ist weiterhin unklar.

1997 konnte von dem Halle-Wittenberger Team um Rieger et al. ebenfalls mittels <sup>111</sup>In-Octreotide Szintigraphie gezeigt werden, dass die Oct-Aufnahme bei 42 Patienten mit Hypophysenadenomen signifikant mit der Tumorlage und dem Alter des Patienten korreliert (89). Dabei fanden Sie heraus, dass kleine Adenome meist rezeptornegativ waren, während große supraselläre Tumore Rezeptorpositivität aufwiesen. Da in dieser Studie sowohl kleine als auch große Tumore in ähnlicher Weise auf das Medikament ansprachen postulierten Sie, dass ein positiver Octreoscan nicht für die Vorhersage des Ergebnisses einer Oct-Therapie, abhängig von der Tumorgröße, genutzt werden kann.

Welche Faktoren für die Hormon- und Volumenansprache determinieren, ist bisher anhand von Studien nicht ausreichend geklärt und es stellt sich die Frage, warum bestimmte Patienten sehr gut auf die medikamentöse SSA-Therapie ansprechen und andere Patienten keine Reaktion bezüglich Symptomatik und Laborparameter zeigen.

Eine Möglichkeit der indirekten Klärung bietet die postoperative Bestimmung des sst-Status des einzelnen Akromegaliepatienten.

Seit Jahrzehnten ist bekannt und vielfach untersucht worden, dass SSA nach ausreichender Therapiezeit die GH- und IGF-1-Konzentration bei einigen, aber nicht bei allen Patienten signifikant senken können (90,91).

Die hier vorliegende Studie zeigt erstmals eine direkte Gegenüberstellung der immunhistochemischen Expression der Proteine von sst-Subtypen von medikamentös mit SSA vortherapierten mit primär operierten Akromegaliepatienten, sowie an gesundem Hypophysen- und Pankreasgewebe.

Die durch unsere Experimente erhaltene Rezeptorverteilung entspricht weitgehend den bisherigen Literaturangaben (83,90), so dass man davon ausgehen kann, dass unser untersuchtes Kollektiv repräsentativ war und die Ergebnisse aussagekräftig sind. Beide Studiengruppen sind in ihrer Grundstruktur weitgehend identisch und entsprechen damit anderen untersuchten Populationen von Akromegaliepatienten.

Unsere guten Laborergebnisse wurden mit subtypspezifischen affinitätsgereinigten AK aus polyklonierten Kaninchen-Antiseren gegen sst<sub>1</sub>, sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> und sst<sub>5</sub> durchgeführt. Die sehr spezifischen Färbungen, die individuellen patientenabhängigen Expressionen und die zellulären Lokalisationen der Subtypen zeigt die Abbildung 3.4.3 im Ergebnisteil.

Die Produktion und Charakterisierung der Somatostatin-Rezeptor-subtypspezifischen AK wurde bisher in vielen Arbeiten, unter anderem von Schulz et al., umfassend beschrieben und charakterisiert (77,78,81,92,93). Mit den gleichen subtypspezifischen AK, welche auch in der vorliegenden Studie verwendet wurden, konnten sie in 69% der Meningeompatienten sst<sub>2A</sub> nachweisen, während alle anderen Rezeptorsubtypen nur sporadisch detektiert wurden. Sie beschrieben die auch von uns genutzten Sensitivitätsund Spezifitätsnachweise und folgerten, dass diese einfache immunhistochemische Methode zur Identifikation derer Patienten nützlich sein kann, die auf eine mögliche Therapie mit sst<sub>2</sub>-selektiven Agonisten ansprechen.

Die durchgeführten Kontrollverfahren zeigen, dass diese AK selektiv ihr zugehöriges Protein in formalinfixierten menschlichen Geweben detektieren. Mehrmals wurde mit Western Blot Analysen nachgewiesen, dass sst-transferierte humane embryonale Nierenzellen (HEK-293-Zellen) eine einzelne Bande des zugehörigen Molekulargewichtes nur in sst-transferierten Zellen detektieren (78,92). Sst-transferierte humane embryonale Nierenzellen wurden selektiv mit dem anti-sst-AK gefärbt, während Wildtypzellen keine Färbung zeigten. Immunodotblotanalysen zeigten, dass Kreuzreaktionen mit anderen Subtypen ausgeschlossen sind und Antiseren unzweideutig Somatostatin-Rezeptor-Subtypen in humanen Meningeomen, Brust- und Ovarialkarzinomen, Gastrinomen, Insulinomen, neuroendokrinen Tumoren und in normalen Pankreasgewebe detektieren (78,92,93).

Wir zeigten ebenso, dass die Färbungen aller Antiseren durch Präinkubation mit immunisierenden Peptiden aufgehoben werden konnte.

Es zeigten sich in der vorliegenden Arbeit auch methodische Probleme:

Die Differenz der verschiedenen im Handel erhältlichen Assay-Systeme (RIA, ELISA, IRMA, polyklonaler oder monoklonaler Antikörper, unterschiedliche Referenzwerte) erschweren die Vergleichbarkeit der GH-Bestimmung und damit die Normierung der diagnostischen Grenzwerte in den verschiedenen Studien. Von der WHO wird weiterhin die Nutzung des polyklonalen RIA empfohlen. Kriterien sind eine adäquate Sensitivität (GH mindestens  $0.5~\mu g/I$ ), Validierung des Assays, Spezifität, Zuverlässigkeit und Reliabilität (28).

In die Definition der Diagnosekriterien für die Akromegalie gehen bisher die Geschlechtsspezifität und die Altersabhängigkeit der GH-Sekretion nicht ein. Beide Phänomene sind jedoch sowohl bei Gesunden, als auch bei Patienten mit Akromegalie nachweisbar und sollten Beachtung finden (94).

IGF-1 ist GH-abhängig, vermittelt nahezu alle GH-Effekte und spiegelt die 24-h-Sekretion dieses Hormons wieder. Das GH stimuliert die Synthese und Sekretion von IGF-1 in der Leber und anderen Zielorganen. 95% des zirkulierenden IGF-1 sind an sechs verschiedene IGF-Bindungsproteine (IGFBP 1-6) gekoppelt. GH stimuliert IGFBP-3, das quantitativ wesentliche IGF-Bindungsprotein. Biologisch aktiv ist jedoch nur das freie, ungebundene IGF-1, da ausschließlich dieses am IGF-Rezeptor koppelt (95,96).

Bei Gesunden korreliert die IGF-1 Konzentration positiv mit dem Mittelwert des 24-h GH-Profils und mit dem Nadir der GH-Konzentration während einer oralen Glukosebelastung. Bei Patienten mit Akromegalie korreliert IGF-1 linear mit dem Logarithmus der Wachstumshormonkonzentration.

Das IGF-1 zeigt eine gute Korrelation mit dem Alter. Pro Dekade wird, wie in Tabelle 2.4.1 ersichtlich, eine Reduktion der IGF-1-Konzentration um 10-16% beobachtet. Auch bei Patienten mit vergleichbar pathologisch erhöhter GH-Konzentration nimmt die IGF-1 Konzentration in höherem Alter ab (97).

Ebenfalls wurde eine Geschlechtsabhängigkeit der IGF-1-Konzentration, mit niedrigeren Konzentrationen bei Frauen, gezeigt (98).

Zur Bestimmung des IGF-1 ist die Abtrennung der Bindungsproteine erforderlich. Dies geschieht bei Verwendung des RIA mittels Säure-Ethanol Extraktion und "size-exclusion chromatography". Die intra-individuelle Variabiltät der IGF-1 Konzentration liegt bei 14% (99).

Bei autonomer GH Sekretion ist die IGF-1-Konzentration in der Regel erhöht. Die Sensitivität eines IGF-1 Wertes für die Diagnose der Akromegalie liegt bei 100%, die Spezifität bei 97% (100). Während sich statistisch gute Korrelationen für die IGF-1- und Wachstumshormon-Plasmakonzentration ergeben, lassen sich immer wieder Diskrepanzen für den individuellen Patienten nachweisen. So zeigten Holly et al., dass in 27% der Patienten die IGF-1 und GH-Werte diskrepant waren: normale GH-Konzentration und erhöhtes IGF-1 in 15%, erhöhte GH-Werte und normales IGF-1 in 8% (100).

Unsere Ergebnisse sind mit einer neuen immunhistochemischen Studie an 90 GH-sezernierenden Hypophysenadenomen vereinbar (48). Die meisten Resultate vorausgehender molekularer Studien nutzten mRNA-Analysen und die Rezeptorautoradiographie (49,86,101-104). Tumor mRNA-Level reflektieren jedoch nicht zwingend das Vorhandensein von Rezeptor-Proteinen der einzelnen Zellen. In der Literatur wurden Konflikte zwischen den Ergebnissen der sst-mRNA und der Immunhistochemie in nicht-hypophysären Tumoren beschrieben (105).

Die Nutzung der Immunhistochemie mit subtypspezifischen AK in der klinischen Routine zur Analyse der Rezeptor-Expression publizierten 2002 Kulaksiz et al. (81). Das Team untersuchte die Verteilung der Rezeptoren an Gastrinomen, Insulinomen und an Tumoren, die mit dem Karzinoidsyndrom assoziiert waren. Die Subtypen 1, 2A, 3 und 5 wurden in allen untersuchten Geweben detektiert, wobei kein signifikanter Unterschied in den Tumorarten gefunden wurde, aber in jedem Patienten zeigte sich eine individuelle Verteilung.

Als Referenzorgan wurde hier, wie auch in unserer Studie, gesundes humanes Pankreasgewebe verwendet. Sie kamen zu dem gleichen Ergebnis wie in der vorliegenden Arbeit: man kann mit der Immunhistochemie die Verteilung der sst-Subtypen jedes einzelnen Patienten mit neuroendokrinen Tumoren beurteilen und daraus die subtyp-spezifischen SSA gezielt einsetzen.

Wie in unseren Untersuchungen gezeigt wurde, ist die morphologische Lokalisation der Rezeptorproteine an der Zellmembran für eine präzise Evaluation des Tumor-Rezeptor-Status notwendig (48).

Bisher fehlt jedoch für die Subtypbestimmung eine vergleichbare zweite Methode. Um die Spezifität und Sensitivität exakt angeben zu können, müsste ein Verfahren entwickelt werden, welches mit gleichen Geweben und Kontrollen durchgeführt wird und welches annähernd ähnliche Ergebnisse liefert. Bis dato ist dies jedoch noch nicht möglich. Es besteht die Möglichkeit, dass in jeder Färbung die gleichen Fehler, z.B. durch Handhabung der Chemikalien oder durch Fehler während den Inkubationszeiten auftreten und somit die Ergebnisse verfälscht werden.

Um unsere Ergebnisse zu validieren, müsste man als ersten Untersuchungsschritt an einer definierten Gruppe von Patienten sst-Rezeptoren nach der Operation bestimmen, anschließend müsste es bei einer Gruppe dieser Personen zu einem Rezidiv kommen, welches mit SSA behandelt und anschließend erneut operiert wird. Aus dem gewonnenen Operationsmaterial müssten die sst-Subtypen bestimmt und anschließend ein Vergleich zwischen den Patientengruppen mit und ohne Rezidiv gezogen werden. Dies ist aufgrund der sehr kleinen Rezidivgruppe und aus ethnischen Gründen nicht möglich, da man immer versucht mit jedem Therapieschema ein Rezidiv zu vermeiden, und eine bestmögliche Lebensqualität für den Patienten zu erzielen.

Anhand der vor Beginn dieser Studie durchgeführten Literaturrecherche war von unseren Untersuchungen zu erwarten, dass die GHR positiv mit der Anwesenheit des sst<sub>2</sub> korrelieren. In fast allen bisher durchgeführten Studien wurden aber auch Patienten ohne diesen Rezeptor-Subtyp gefunden. Warum es Tumore ohne sst<sub>2</sub> in der Hypophyse gibt, bleibt zurzeit nur Spekulation.

Unklar ist bisher auch, warum sst₄ in adulten Hypophysengewebe nicht zu detektieren ist. Panetta et al. konnten mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und des Southern Blots in allen 15 untersuchten fetalen Hypophysen nachweisen, dass in diesen Geweben alle fünf sst-Subtypen erxprimiert werden (104).

Durch bisher unbekannte Mechanismen muss also bei jenen Patienten, welche als GHNR deklariert wurden, sst<sub>2</sub> verloren gegangen sein.

Wir zeigten immunoreaktiv auf Proteinebene, dass sst<sub>2</sub> und sst<sub>5</sub> in allen Patienten, welche im Vorfeld als Responder definiert wurden, detektierbar waren. Im Kontrast dazu wies keiner der NR detektable sst<sub>2</sub> auf, obwohl sst<sub>5</sub> in der Mehrzahl dieser Fälle positiv nachzuweisen war.

Was aber genau mit dem Rezeptor während der Therapie geschieht, bleibt ungeklärt.

Übereinstimmend mit unserer Untersuchung sind wir zu ähnlichen Folgerungen gelangt, wie bisher auf mRNA-Ebene beschrieben: Sst₅ wurde in Gruppe B ebenfalls bei der Mehrzahl der GH-sezernierenden Adenom-Patienten (85%) gefunden. Ein Unterschied zwischen R und NR bezüglich dieses Rezeptor-Subtyps war ersichtlich. Das Ergebnis von 93% (R) vs 71% (NR) ist jedoch nicht signifikant. Hierfür spricht auch die ähnlich hohe Inzidenz dieses Rezeptors (92%) in der primär chirurgisch resezierten Gruppe.

Wir konnten immunhistochemisch deutlich auf Proteinebene demonstrierten, dass sst<sub>2A</sub> mit der Senkung der GH-Konzentration während der SSA-Therapie korreliert. Ein Hinweis darauf wurde bereits, anhand der Korrelation der sst<sub>2</sub>-mRNA-Expression und dem Abfall der GH-Konzentration während SSA-Therapie in menschlichen somatotrophen Zellen in vitro, gegeben (102). Obwohl diese Autoren keinen Vergleich zwischen der Beziehung ihrer in vivo Ergebnisse und der Anwesenheit der sst-Subtypen-mRNA zeigten, konnten ihre Ergebnisse unsere Feststellungen voraussagen, trotz geringerer Patientenzahl und nur einer Einzeldosis Oct. Patienten mit einem GH-Abfall von weniger als 50%, bei uns als NR definiert, zeigten eine geringere sst<sub>2</sub>-mRNA-Expression im Vergleich zu den Patienten mit einem höherem Abfall der Wachstumshormonsuppression.

Der Gesamt-GH-Abfall in Gruppe B von 67,6% nach präoperativer Oct-Behandlung spricht für ein Ansprechen auf das Medikament bei der Mehrzahl der Patienten.

Bei all denjenigen, die als R definiert wurden, betrug der GH-Abfall insgesamt 81,3%. Es ergab sich hierbei, wie von uns aus dem bisherigen Literaturstudium erwartet, dass bei keinem NR ein detektabler sst<sub>2</sub> nachgewiesen werden konnte.

Neu war in den vorliegenden Untersuchungen erstmals das eindeutige Ergebnis, dass in Gruppe B alle sst<sub>2</sub>-negativen Patienten eindeutig keine Reaktion der GH-Konzentration auf das Medikament Oct zeigten.

Eine Vielzahl anderer Studien haben eine positive Korrelation zwischen der sst<sub>2</sub>-mRNA-Expression und der Ansprache auf eine Einzeldosis Oct in vivo gezeigt, dies ist die erste Studie, welche diese Korrelation auch auf Proteinebene zeigt. Unter anderem wurde dies an sieben, 10 und 15 Akromegaliepatienten (106-108) beschrieben, bei welchen die sst-mRNA-Expression mit in vivo Effekten auf die GH-Suppression nach einer Oct Einzeldosis (106,107) oder nach 6-monatiger Oct-LAR-Therapie nach chirurgischer Resektion (108) korreliert wurde. Diese Ergebnisse der signifikant geringeren sst<sub>2</sub>-mRNA-Expression konnten wir auf Proteinebene erweitern und bestätigen. Wir demonstrierten außerdem, dass die immunzytochemische Abwesenheit des sst<sub>2</sub> in Tumoren, ein Nichtansprechen auf die Oct-Therapie bedeutet.

Die Aussage von Schaer et al. (84), dass die Oct-Bindung und die in dieser Arbeit ermittelte Response mit den Subtypen 2 und 5 korreliert, können wir ebenfalls bestätigen. 13 der 14 Patienten, welche sowohl sst<sub>2</sub> als auch sst<sub>5</sub> exprimierten konnten wir im Vorfeld als R definieren.

Bei Patienten, welche nicht mit SSA therapiert wurden, konnte die sst<sub>2</sub>-Expression konsequent auf Protein- und mRNA-Level nachgewiesen werden (109). Dies stimmt mit unseren immunhistochemischen Daten überein. In Gruppe A, den primär chirurgisch behandelten Patienten, war bei allen 14 Patienten sst<sub>2</sub> nachweisbar. Konträr dazu waren alle GHNR sst<sub>2</sub>-negativ. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass diese Differenz der sst<sub>2</sub>-Expression zwischen vor- und untherapierten Patienten mit einem Selektions-Bias zusammenhängt. Vortherapierte Tumore waren meist MA, während bei den primär operierten Adenomen lediglich 9 von 14 MA waren.

Das Vorhandensein beider Rezeptoren, sst<sub>2</sub> und sst<sub>5</sub>, könnte möglicherweise den Effekt der physiologischen SS-Sekretion auf das Wachstum des Hypophysenadenoms erhöhen. Es fand sich keine Korrelation zwischen der Expression des sst<sub>2</sub> und der Adenomgröße, auch in der Literatur wurde dies bisher nicht beschrieben.

Es wurde bisher demonstriert, dass beides, die Aktivität des sst<sub>2</sub> und sst<sub>5</sub>, die GH-Sekretion supprimiert. Die funktionelle Assoziation dieser Rezeptoren resultiert in einem additiven / synergistischen Abfall der GH-Konzentration in fetalen Hypophysen und somatotrophen Adenomen (110-112). Unsere Definition der GHNR beinhaltet eine

stufenweise Differenzierung, z.B. eine 50%ige Suppression des GH. Die insuffiziente Ansprache des GH bei diesen Patienten könnte möglicherweise die klinische Korrelation der Expression nur des sst<sub>5</sub> sein. Das Vorhandensein beider Rezeptoren ist wahrscheinlich nötig für einen größeren als 50%igen Abfall des Wachstumshormons.

Eine alternative Erklärung könnte die Oct-induzierte Beeinflussung des sst<sub>2</sub>, im Sinne einer Wirkungsabschwächung, sein, da dieser Rezeptor bei allen Personen ohne Oct-Therapie, wie auch in den fetalen Hypophysen, primär vorhanden zu sein scheint.

Dies wurde kürzlich in einer anderen großen Serie mit der immunhistochemischen Methode demonstriert (48). Die komplette Abwesenheit des sst<sub>2</sub> in Oct-vortherapierten Tumoren und die Korrelation der sst<sub>2</sub>-Expression mit einer positiven GH-Ansprache zeigen eine mögliche Aktivitätsminderung des sst<sub>2</sub>, induziert durch eine Oct-Langzeittherapie in einer Subgruppe von somatotrophen Adenomen. Dies ist möglicherweise ein dosis- und zeitabhängiger Effekt, welcher bisher noch nicht in vitro beobachtet wurde. Zurückzuführen ist dies auf die bekannten Schwierigkeiten der Aufrechterhaltung der Gewebekulturen von humanen somatotrophen Geweben über eine längere Zeit.

Die variable Ansprache der Patienten auf die medikamentöse Therapie mit dem SSA Oct und Lanreotid und die Rolle der sst in den verschiedenen Hypophysenadenomen wurde auch von Hofland et al. 2004 veröffentlicht (85). Die genutzten SSA binden bevorzugt sst<sub>2</sub>. Auch ihre Studie ergab, dass sst<sub>2</sub> und sst<sub>5</sub> in GH-sezernierenden Adenomen verstärkt exprimiert werden und dass beide Subtypen in der Regulation der GH-Sekretion involviert sind, was wiederum mit unseren Ergebnissen korreliert.

Aufgrund dieser Untersuchungen, können wir die bisherigen Literaturangaben belegen und festhalten, dass bei jenen Patienten, welche sst<sub>2</sub> exprimieren die Oct Therapie eine effektivere Wirkung auf die Senkung der GH-Konzentration erzielt.

Der Zusammenhang des GH- und des IGF-1-Abfalls mit der Expression von sst<sub>2</sub> wurde in zahlreichen Studien dargestellt:

Petersenn aus Essen machte 2005 eine reduzierte Dichte von sst<sub>2</sub> für die erfolglose Senkung der GH- und IGF-1-Konzentration verantwortlich (113). Er untersuchte in einer Metaanalyse von fünf Studien mit langwirksamen SSA, ebenfalls auf mRNA-Ebene, die

GH- und IGF-1-Suppression. Die GH-Konzentration wurde in 68% und der IGF-1-Wert in 61% der 107 Patienten gesenkt. Eine TVR erfolgte bei 51%. Diese Untersuchung konnte, im Einklang mit unseren Ergebnissen, eine höhere Effektivität von SSA mit spezifischen Bindungsprofilen zeigen.

Wie auch Miller et al. 1995 konnten wir keinen Zusammenhang zwischen der Senkung der GH-Konzentration und dem Vorhandensein des sst<sub>1</sub> zeigen (47). Bei allen R wurde dieser Subtyp in 85% nachgewiesen und bei 83% der NR, was keine Signifikanz ergab, da auch in der primär chirurgisch behandelten Gruppe sst<sub>1</sub> in 83% der Fälle gefunden wurde.

Miller und Mitarbeiter untersuchten mit der real-time-PCR (RT-PCR) in vitro die Rezeptor-mRNA-Expression in gesunden Hypophysen und Hypophysenadenomen, um herauszufinden, welche spezifische Subtyp-mRNA für die Hemmung des GH nötig ist. Sie fanden in allen normalen Hypophysen und in allen Adenomen die Subtypen 1, 2 und 5, während sst<sub>3</sub> in keiner normalen Hypophyse und nur in einem Adenom, konträr zu unseren Ergebnissen, detektierbar war. Sst<sub>4</sub> war in keinem Hypophysengewebe nachweisbar. Sie kamen zu dem Entschluss, dass die Abwesenheit von sst<sub>1</sub> die Fähigkeit des Somatostatins, das GH zu supprimieren, nicht zu beeinflussen scheint.

Bis heute gibt es in der vorliegenden Literatur keine Ergebnisse, welche einen Zusammenhang des sst<sub>1</sub> mit der GH-Suppression beim Menschen zeigen.

Die negative Korrelation von sst<sub>3</sub> mit der Tumorvolumenreduktion ist überraschend, da bereits 1996 von dem kanadischen Team um Sharma et al. gezeigt wurde, dass sst<sub>3</sub> in vitro die Apoptose induziert. Dies hängt mit der dephosphorylierungsabhängigen Konformationsänderung des p53 und der Induktion von Bax zusammen (114).

Losa et al. demonstrierten, dass vor- und untherapierte Hypophysenadenome bei Akromegaliepatienten ähnliche apoptotische Indizes haben (115), während der Hauptproliferationsmarker Ki-67 bei den vortherapierten Tumoren um 53% weniger exprimiert wurde als bei untherapierten Tumoren. Anhand dieser und anderer Ergebnisse ist die Tumorvolumenschrumpfung möglicherweise doch zurückzuführen auf einen Zellzyklusarrest mit Reduktion des Tumorwachstums, übermittelt via sst<sub>2</sub> und sst<sub>5</sub> (116).

Die TVR in Gruppe B von 36% (TVR) vs 23% (TVNR) unterscheidet sich nicht signifikant.

Was jedoch in unserer Studie deutlich zu erkennen war, ist dass bei den Patienten die eine TVR zeigten sst<sub>3</sub> immunhistochemisch verstärkt nicht nachgewiesen werden konnte. Dies ist konträr zu bisherigen Forschungsergebnissen. Anhand dessen muss festgehalten werden, dass die TVR zusätzlich zu den sst-Subtypen über andere Mechanismen, welche noch weitere Untersuchungen benötigen, erfolgen muss.

Alternativ könnte die Tumorvolumenschrumpfung mit der Inhibition der Hormonsynthese während der SSA-Therapie in Zusammenhang stehen. Morphologische Änderungen nach Oct-Therapie zeigten kleinere kern- und zytoplasmatische Areale im Vergleich zu untherapierten Tumoren (117). Die TV-Abnahme ist nach Beendigung der Therapie schnell reversibel (71).

Beide Beobachtungen deuten auf eine mögliche individuelle Volumenreduktion der einzelnen Zellen und nicht auf eine Reduktion der Zellzahl insgesamt hin.

Es wurde auch ein eventueller Zusammenhang der Tumorschrumpfung mit einer Aktivierung von sst<sub>2</sub> und sst<sub>5</sub> anstatt von sst<sub>3</sub> beschrieben (117). Obwohl wir nicht in der Lage waren eine Korrelation zwischen den Rezeptor-Subtypen 2 und 5 und der Tumorvolumenschrumpfung herzustellen, vielleicht aufgrund der geringen Fallzahl, schließt dies keinen funktionellen Effekt abhängig von diesen Rezeptoren aus. Die von uns beobachtete Korrelation zwischen der Abwesenheit von sst<sub>3</sub> und der Tumorschrumpfung ist von funktioneller Relevanz und benötigt weitere klinische Untersuchungen.

Neueste Literatur von 2006 macht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen sst<sub>2</sub> für die TVR verantwortlich. Das italienische Team um Ferrante et al. führte eine Studie an acht somatotrophen Tumoren, die ähnliche Level an sst<sub>2</sub> und sst<sub>5</sub> exprimierten, durch (118). Zur Rezeptorbestimmung nutzten sie die RT-PCR und Western Blot Analysen. Das Ziel Ihrer Untersuchungen war, den Effekt von Oct und superselektiven sst<sub>2</sub>- (BIM23120) und sst<sub>5</sub>- (BIM23206) Analoga auf die apoptotische Aktivität und die Apoptose-Gen-Expression in menschlichen somatotrophen Tumorzellen zu evaluieren. Ergebnisse dieser Studie waren, dass diese selektiven Rezeptor-Analoga durch Erhöhung der p27-Aktivität und Verminderung der Cyclin D1 Expression einen Wachstumsarrest

induzierten. Sie konnten jedoch zeigen, dass Oct die Apoptose in menschlichen somatotrophen Tumorzellen über sst<sub>2</sub> induziert und nicht nur zu einer Zellverkleinerung führt. Diese von Ferrante et al. getroffene Aussage konnten wir nicht bestätigen, da unsere Ergebnisse zwischen TVR und sst<sub>2</sub>-Nachweis nicht signifikant waren.

Anhand der Untersuchungen der italienischen Gruppe wurde verdeutlicht, dass der nachgewiesene Oct-Effekt zusammen mit dem zytostatischen Effekt der verwendeten Analoga bei Akromegaliepatienten für die Tumorvolumenschrumpfung verantwortlich gemacht werden kann. Diese Aussage sollte jedoch aufgrund der Ergebnisse unseres Kollektives nicht verallgemeinert werden und zu weiteren klinischen Studien anregen.

Auch ein positiver sst<sub>3</sub>-Status konnte anhand der Literaturrecherche für die TVR verantwortlich gemacht werden. Hierzu konnte eine Fallbeschreibung von 2006 aus Brasilien von Casarini et al. gefunden werden (119).

Bei dem 23-jährigen Akromegaliepatienten konnte mit LAN-SR und Oct-LAR eine 75%ige TVR aber keine GH- und IGF-1-Normalisierung erreicht werden. Nach chirurgischer Resektion des Tumors erfolgte eine Bestimmung der Expression der sst-Subtypen mittels RT-PCR. Hiermit zeigte sich ein ungewöhnliches Rezeptor-Profil: fast exklusiv wurde sst<sub>3</sub> exprimiert. Das Team suggerierte daher für den sst<sub>3</sub> anhand des unüblichen klinischen Bildes und Somatostatin-Rezeptor-Profils eine wichtige Rolle für die TVR. Die genutzten Medikamente binden bevorzugt sst<sub>2</sub> und sst<sub>5</sub>, welche bei diesem Patienten nicht zu detektieren waren, und vermitteln über diese Rezeptoren ihre GH- und IGF-1-senkende Wirkung. Damit kann das Nicht-Ansprechen von Oct und LAN auch anhand unserer Ergebnisse erklärt werden.

Aber auch dieser Fallbericht kann nicht verallgemeinert werden, da sich in den vorliegenden Untersuchungen eine TVR bevorzugt bei Patienten ohne sst<sub>3</sub> zeigte.

Der Erfolg der medikamentösen präoperativen Therapie wird zusätzlich erhöht, wenn zu einem positiven sst<sub>2</sub>-Status außerdem ein positiver sst<sub>1</sub> zu finden ist.

Unter allen Respondern wiesen 85% beide Subtypen auf. Ebenfalls 85% der R exprimierten sst<sub>1</sub>, sst<sub>2</sub> als auch sst<sub>5</sub>.

Seit der Entdeckung der verschiedenen Rezeptor-Subtypen sind immer wieder Medikamente in klinischen Studien erprobt worden, von welchen man sich eine spezifischere Rezeptor-Bindung erhoffte.

So sind die Chimere, wie das BIM23A760 und das BIM23244, die an  $sst_2$ -,  $sst_5$ - und Dopaminrezeptoren koppeln, hergestellt worden (120). Diese erzielen laut den Untersuchungen von Jaquet et al. einen stärkeren maximalen GH-Abfall als die jeweilige Aktivierung des einzelnen Rezeptors. Ursächlich hierfür ist möglicherweise die heterodimere Assoziation beider Rezeptoren, die zu einer verstärkten biologischen Aktivität führt. Diese Chimere können auch einen GH-Abfall bei Oct-resistenten Personen erreichen (120).

Shimon et al. konnten nachweisen, dass das SSA PTR-3173 mit einer hohen Affinität zum sst<sub>2</sub>, sst<sub>4</sub> und sst<sub>5</sub> das GH in vitro potent senkt ohne dabei einen Effekt auf die Insulinsekretion zu verursachen (121).

Die Tumore, bei denen sst<sub>1</sub> und sst<sub>5</sub> nach einer unzulänglichen Oct-Therapie nachweisbar bleiben, könnten einen Angriffspunkt für den Multirezeptor-Liganden Pasireotide ® (SOM230) darstellen (122). Es gibt Hinweise, dass insbesondere Octresistente Patienten durch eine hohe Zahl des sst<sub>5</sub> gekennzeichnet sind. Dies lässt SOM230 als ein viel versprechendes Medikament gerade für diese Patientengruppe erscheinen. Möglicherweise wird SOM230 durch die hohe Affinität zu sst<sub>1</sub> und sst<sub>3</sub> als eine tumorwachstumshemmende Substanz ausgezeichnet. Diese beiden Subtypen vermitteln ihre Anti-Tumor Effekte durch Hemmung des Zellzyklus und Induktion der Apoptose.

Sollten sich diese bisherigen Erkenntnisse bestätigen, müsste der Einsatz der SSA zur präoperativen Therapie der Akromegalie, welche bisher nicht routinemäßig indiziert ist, überprüft werden. Das SSA SOM230 mit einer hohen Affinität zu sst<sub>1</sub>, sst<sub>3</sub> und sst<sub>5</sub> hat im Vergleich zum Oct eine geringere Affinität zu sst<sub>2</sub> und eine siebenmal längere Plasma-HWZ. Es inhibiert das freie IGF-1 potenter als Oct, was van der Hoek et al. 2005 belegen konnten (123).

Bei SOM230 konnte bei Rhesusaffen nachgewiesen werden, dass eine lang anhaltende Suppression des IGF-1 besteht (123). Dies kann mit einer unterschiedlichen intrazellulären Dynamik der Liganden-Rezeptorkomplexe der Subtypen 2 und 5 zusammen hängen, da beide nach der Ligandenbindung internalisiert werden. Sst<sub>5</sub> weist jedoch ein frühes und ausgeprägtes Recycling aus intrazellulären Speichern, zurück in die Zellmembran, auf. Somit steht der Rezeptor für eine erneute Bindung zur Verfügung.

Dieser Multirezeptor-Ligand könnte bei Tumoren, die eine insuffiziente GHR zeigen, bei welchen aber sst<sub>1</sub> und sst<sub>5</sub> persistieren, verwendet werden.

In den letzten Jahren ist die medikamentöse Therapie immer effektiver und praktikabler geworden und es stellte sich die Frage, ob die Behandlung noch effektiver gestaltet werden kann, wenn man die spezifische sst-Subtypen-Expression des Patienten individuell berücksichtigt und gezielt spezifische Antagonisten einsetzt.

Dafür ist eine prämedikamentöse pharmakologische Typisierung der Somatostatin-Rezeptor-Subtypen bei allen Patienten notwendig. Vielleicht könnte diese Therapieform sogar die derzeitige operative Goldstandarttherapie der transsphenoidalen Tumorresektion verdrängen.

Dies ist die erste Studie, welche die immunhistochemische Expression der sst-Subtypen auf Proteinebene in einer großen Anzahl somatotropher Adenome, welche primär operiert oder präoperativ mit dem SSA Octreotid behandelt wurden, gegenüberstellt.

In unbehandelten Tumoren wurden  $sst_1$ ,  $sst_{2A}$ ,  $sst_3$  und  $sst_5$  entsprechend immunhistochemisch exprimiert. In vorbehandelten Adenomen zeigte sich eine Expression des  $sst_{2A}$ , welche signifikant mit dem Abfall der GH-Konzentration korreliert. Dies weist auf die wichtige Rolle dieses Rezeptor-Subtyps auf die Hemmung der GH-Sekretion hin. Das Fehlen des  $sst_{2A}$  in Adenomen, welche nicht auf den GH senkenden Effekt des Oct ansprachen, spricht für eine Aktivitätsminderung dieses Rezeptors während der Langzeittherapie mit SSA.

Unsere Daten indizieren, dass die Rolle des sst<sub>3</sub> möglicherweise unbedeutend für die Reduktion des Tumorvolumens in somatotrophen Adenomen ist.

## 5. Zusammenfassung

Die Akromegalie bleibt nach wie vor eine Herausforderung an den behandelnden Arzt.

Das Somatostatinanalogon Octreotid bindet bevorzugt am  $sst_{2A}$  und in geringerer Intensität am  $sst_5$ . Obwohl beide Rezeptor-Subtypen in GH-sezernierenden Adenomen exprimiert werden, kontrolliert Oct nur in 65% der Akromegaliepatienten die GH-Sekretion. Deshalb untersuchten wir die immunhistochemische Expression der sst-Subtypen mit der Avidin-Biotin-Komplex-Methode in einer Gruppe somatotropher Adenome.

Die Akromegaliepatienten wurden ohne medikamentöse Therapie (Gruppe A, n=14) oder mit Oct (Mediandosis (Min-Max)) in einer Dosis von 1250 (300-1500) μg/d für 5,6 (3-9) Monate (Gruppe B, n=20) vor chirurgischer Resektion therapiert.

In Gruppe B reduzierte Oct die GH-Sekretion in mehr als 50% bei 14 (70%) Patienten, diese wurden als GH-Responder deklariert. Sechs Patienten mit einer geringeren als 50% igen GH-Suppression wurden als GH-non-Responder bezeichnet. Wir nutzten eine Reihe umfassend charakterisierter Antikörper um den immunhistochemischen sst-Status in somatotrophen Adenomen zu ermitteln und die Expression zwischen den beiden Gruppen zu vergleichen.

Es zeigte sich in Gruppe A, dass alle Tumore immunoreaktiv für  $sst_{2A}$  und alle, außer ein Tumor,  $sst_5$  aufwiesen. Eine ähnliche Verteilung fanden wir bei den R in Gruppe B. Im Gegensatz dazu exprimierte keiner der GHNR detektable  $sst_{2A}$  ( $sst_{2A}$ :GHR vs GHNR, p<0,001), während  $sst_5$  in 70% der Adenome gefunden wurde.  $Sst_1$  und  $sst_3$  wurden in 84% und 21% aller Fälle nachgewiesen.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Resistenz auf Oct in GH-sezernierenden Adenome durch einen selektiven Verlust des sst<sub>2A</sub> möglich ist, hinweisend auf die bedeutende Rolle dieses Rezeptor-Subtyps für die Hemmung der GH-Sekretion. Die persistierende Expression der Rezeptor-Subtypen 1 und 5 weist darauf hin, dass diese Tumore potentielle Ziele für Pan-Somatostatin-Analoga darstellen.

In dieser Studie von 20 Akromegaliepatienten konnte gezeigt werden, dass die TV-Responder verstärkt keinen sst<sub>3</sub> aufwiesen.

Unsere Daten zeigen, dass das Vorhandensein von sst<sub>3</sub> möglicherweise unbedeutend für die Tumorvolumenreduktion in somatotrophen Adenomen ist. Um dies zu verallgemeinern sind umfassendere Studien nötig.

Unklar ist nach wie vor, wovon die Volumenreduktion tatsächlich abhängt.

# 6. Anhang

Tabelle 1.2: Symptomatik der Akromegalie

Symptome	Häufigkeit (%)	Symptome	Häufigkeit (%)
	(/9)	- Cymptomo	(,,,
somatische			
Veränderungen		endokrine Störungen	
		Struma mit /ohne	
Akrenvergrößerung	100	Funtkionsstörung	70
Weichteilschwellung von	400		50
Händen und Füßen	100	<ul><li>Amenorrhö</li><li>Libido-, Potenzstörung</li></ul>	50
		(Männer)	45
supraorbitale Wülste	80	Galaktorrhö Frauen	40
Arthropathie	75	Männer	< 5
Kopfschmerzen	70	Hyperprolaktinämie	35
Parästhesien	60	verminderte Glucosetoleranz	30
Stimmveränderung,			
Kyphose,		beeinträchtiget Nebennieren-	
Gewichtszunahme	Je 50	Funktion	10
<ul> <li>Photophopie</li> </ul>	40	<ul> <li>manifester Diabetes mellitus</li> </ul>	5
<ul> <li>Karpaltunnelsyndrom</li> </ul>	30		
Prognathismus,			
Malokklussion	30		
lokale Tumoreffekte		Schalfstörungen	
<ul> <li>Sellavergrößerung</li> </ul>	99	Schlafapnoe	bis 50
Gesichtsfeldausfälle	20	Narkolepsie	< 5
Haut		Viszeromegalie	
fleischige und teigige			
Hände	90	<ul> <li>Prostatavergrößerung</li> </ul>	50
Hyperhidrosis	80	Makroglossie	30
Hypertrichose (Frauen)	70	Kolonpolypen	25 – 50
• "skin tags"	35	Analprolaps	Selten
Acanthosis nigricans	25		
kardiovaskuläre			
Symptome		Psychopathologie	
linksventrikuläre     Hyportrophio	25 50	• vormindorto Vitalität I otharaia	50
Hypertrophie  • Hypertonie	25 - 50 25	<ul><li>verminderte Vitalität, Lethargie</li><li>fehlende Selbstachtung</li></ul>	50 35
Herzinsuffizienz	10 - 15	Depression	30
klinisch relevante	10-13	- Depiession	30
Arrythmien	10		

Aus: von Werder. Klinische Neuroendokrinologie, Springer Verlag 2005, 2. Auflage

Tabelle 6.1: Charakterisierung der Patienten mit primär chirurgischer Therapie

Patient	Alter	Ge-	Tumor	Somatostatin Rezeptor Status			
		schlecht	Größe	sst1	sst2	sst3	sst5
1	37 <sup>a</sup>	$\mathbf{w}^b$	MA <sup>d</sup>	pos	pos	neg	pos
2	61	W	MI <sup>e</sup>	pos	pos	pos	pos
3	58	m <sup>c</sup>	MI	pos	pos	neg	pos
4	55	W	MA	pos	pos	neg	pos
5	43	m	MA	neg	pos	neg	pos
6	61	m	MI	pos	pos	neg	neg
7	64	m	MI	pos	pos	pos	pos
8	39	m	MA	neg	pos	neg	pos
9	28	W	MA	pos	pos	neg	pos
10	70	w	MI	pos	pos	neg	pos
11	30	W	MA	pos	pos	pos	pos
12	34	m	MA	pos	pos	neg	pos
13	34	W	MA	pos	pos	pos	pos
14	62	m	MA	pos	pos	neg	pos

MW±SE 48,3±3,9 7w / 7m 5MI / 9MA 12/14 (85%) 14/14 (100%) 4/14 (29%) 13/14 (92%)

<sup>&</sup>lt;u>Tabellenlegende:</u>
<sup>a</sup> Alter bei Diagnosestellung, <sup>b</sup> weiblich, <sup>c</sup> männlich, <sup>d</sup> Makroadenom, <sup>e</sup> Mikroadenom, pos: positive immunhistochemische Färbung, neg: negative immunhistochemische Färbung

Tabelle 6.2: Charakterisierung der Patienten mit präoperativer Oct-Therapie mit GH-Konzentrationen, GH-Abfall, Oct-Dosis, Octreotide Response und Somatostatin-Rezeptor-Status

Patient	Alter	Geschlecht	Tumor-	GH-Profil MW	GH-Profil MW	GH-Abfall	Octreotide	Octreotid-	Som	atostatin F	Rezeptor S	Status
			größe	basal (µg/l)	präoperativ (µg/l)	(%)	Response	dosis (µg/d)	sst1	sst2	sst3	sst5
1	52 <sup>a</sup>	<b>w</b> <sup>b</sup>	MA <sup>d</sup>	37,8	22	-42	NR <sup>†</sup>	1500	pos	neg	neg	pos
2	42	W	MA	10,3	3,7	-64	$R^g$	1500	pos	pos	neg	pos
3	45	m <sup>c</sup>	MA	9,8	6,9	-30	NR	1500	pos	neg	neg	pos
4	66	W	MA	3,7	0,9	-76	R	1500	pos	pos	pos	pos
5	29	m	MA	33,9	33	-3	NR	300	neg	neg	neg	neg
6	25	m	MA	127,9	1,9	-99	R	1500	pos	pos	neg	pos
7	55	W	MI <sup>e</sup>	28,6	9,1	-68	R	1500	neg	pos	pos	pos
8	34	W	MA	63,8	16,7	-74	R	1500	pos	pos	pos	pos
9	33	W	MA	65,3	30,9	-53	R	300	pos	pos	neg	pos
10	31	m	MA	13,7	2,5	-82	R	1500	neg	neg	neg	neg
11	52	W	MA	90,4	0,7	-99	R	1500	pos	pos	neg	pos
12	31	m	MA	86,7	6,4	-93	R	300	pos	pos	neg	pos
13	50	W	MA	29	5,6	-81	R	1000	pos	pos	neg	pos
14	32	m	MA	32,4	4,3	-87	R	300	pos	pos	neg	pos
15	29	W	MA	10,7	6,1	-43	NR	1500	pos	neg	neg	neg
				MW 42,93 ±	MW 10,05 ±							
				6,5 μg/l	2,3µg/l							
16	60	m	MA	72,5	3,6	-95	R	1000	pos	pos	neg	pos
17	55	W	MA	7,3	1,2	-84	R	1000	nd <sup>h</sup>	pos	nd	pos
18	46	W	MA	92,3	15,8	-83	R	1000	pos	pos	neg	pos
19	38	W	MA	8,4	4,3	-49	NR	1000	pos	neg	neg	pos
20	31	m	MA	27,4	14,4	-47	NR	1000	pos	neg	pos	pos
MW±SE	41,8 ± 2,7	12w / 8m	1MA / 19MI	MW 41,58 ± 16,4 µg/l	MW 7,86 $\pm$ 2,9 $\mu$ g/l	-68% ± 5,8	14R / 6 NR	MW 1110 μg/d	16/19 (84%)	13/20 (65%)	4/19 (21%)	17/20 (85%)

<sup>&</sup>lt;u>Tabellenlegende:</u>

<sup>a</sup> Alter bei Diagnosestellung, <sup>b</sup> weiblich, <sup>c</sup> männlich, <sup>d</sup> Makroadenom, <sup>e</sup> Mikroadenom, <sup>f</sup> non-Responder, <sup>g</sup> Responder, <sup>h</sup> nicht definiert (kein Wert vorliegend), pos: positive immunhistochemische Färbung, neg: negative immunhistochemische Färbung

**Tabelle 6.3:** Patienten mit präoperativer Therapie: Tumorvolumina, Tumorvolumenabfall, IGF-1-Konzentrationen, IGF-1-Verhalten während Oct-Therapie

Dallant	T) / le e e e l	T)/	Malana	105 4 104	105 4 104	105 4
Patient	TV basal	TV zur letzten	Volumen-	IGF-1 MW	IGF-1 MW	IGF-1 während Oct
	in mm <sup>3</sup>	Messung in mm <sup>3</sup>	änderung (%)	basal (ng/l)	während Oct (ng/l)	altersbezogen
1	6450,7	6531,4	1	1020,3	746,2	nicht normal
2	3702,9	4397,2	19	849,3	815,7	nicht normal
3	3845,3	2360,4	-39	1030	918,3	nicht normal
4	783,3	691,2	-12	386	350	nicht normal
5	55890,5	27770,1	-50	1936,3	936,7	nicht normal
6	8848,8	796,4	-91	11167,7	124,3	normal
7	3543,7	3386,6	-4	994,7	727	nicht normal
8	5864,3	5298,8	-10	825	947	nicht normal
9	7548,7	5944,7	-21	1153,7	780	nicht normal
10	2544,7	1633,6	-36	621,7	292	nicht normal
11	2760,3	1218,3	-56	1617,3	971,3	nicht normal
12	1583,4	1175	-26	1884	274,3	normal
13	3141,6	586,4	-81	872	190	normal
14	4908,7	2002,8	-59	862,7	385,6	nicht normal
15	2513,3	2387,6	-5	1026,7	1135,3	nicht normal
16	nd <sup>a</sup>	nd	-35	943	589	nicht normal
17	nd	nd	-80	465	217	normal
18	nd	nd	-5	616	589	nicht normal
19	nd	nd	-22	668	226	normal
20	nd	nd	-18	923	612	nicht normal
MW ± SE	7595,4 ± 1887,1 mm <sup>3</sup>	4412,0 ± 994,1 mm <sup>3</sup>	-31,5 ± 5,6 %	1493,1 ± 243,9 ng/l	591,3 ± 61,4 ng/l	5 normal / 15 nicht normal

Tabellenlegende:
a nicht definiert (kein Wert vorliegend)

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ABC Avidin-Biotin-Komplex ACTH Adrenocorticotropes Hormon

AK Antikörper

BCA Bicinchoninsäure

BSA Beef-Serum-Albumin, Rinder-Serum-Albumin

cm Zentimeter (10<sup>-2</sup>)

cm<sup>2</sup> Quadratzentimeter (cm x cm) cm<sup>3</sup> Kubikzentimeter (cm x cm x cm)

CT Computer-Tomographie
DA Dopamin Agonisten
DAB Diaminobenzidin

d.h. das heißt

DPX Einschlußmittel für Färbungen ECL enhanced-chemilumineszenz

EW Einwohner g Beschleunigung

GH Growth Hormone, Wachstumshormon

GH-MW Growth Hormone-Mittelwert
GHNR Growth Hormone Non Responder
GHR Growth Hormone Responder

GHRH Growth Hormone-Releasing Hormone

Glc Glucose

GnRH Gonadotropin-Releasing Hormone

h Stunde

HVL Hypophysenvorderlappen

HWZ Halbwertszeit

IGF-1 Insulin-like growth faktor-1

IGFBP-3 Wachstumsfaktor
IgG Immunglobulin G
IHC Immunhistochemie
i.m. intramuskulär

IRMA immunradiometrischer Assay

IRP Internationale Reference Präparation

i.v. intra venös

kgKG pro Kilogramm Körpergewicht

kDa Kilo-Dalton Liter

LH Luteotropes Hormon
LHRH LH-Releasing Hormone

Lj. Lebensjahr M Molare Masse

MA Makroadenom: eine Tumorausdehnung >10mm

mA Milliampere

MAPK Mitogen aktivierte Proteinkinase

Max Maximum, höchste Hormonkonzentration in dem

jeweiligen Test

MEN Multiple Endokrine Neoplasie

Typ I = Wermer-Syndrom: Hypophysen-,

Nebenschilddrüsen-, Pankreasinseladenome,

Karzinoide

Milligramm (10<sup>-3</sup>) mg

MΙ Mikroadenom: keine Tumorausdehnung >10mm

Minimun, geringste Hormonkonzentration Min

min Minuten

Millionen (10<sup>6</sup>) Mio. Milliliter (10<sup>-3</sup>) ml Millimeter (10<sup>-3</sup>) mm  $\text{mm}^3$ Kubikmillimeter mM Millimolar

**MRT** Magnet-Resonanz-Tomographie

MW Mittelwert

Anzahl der Patienten n

geringste Konzentration eines Hormons in dem Nadir

jeweiligen Test

non-funktionelle Adenome; keine Hormonabgabe NFA

Nanogramm (10<sup>-9</sup>) ng NGS normal goat serum Nanometer (10<sup>-9</sup>) nm

Non-Responder = Patienten, die weniger als 50% NR

Abfall des GH-MW oder weniger als 20% Rückgang

im TV zeigten

Oct Octreotid (Sandostatin®) = Somatostatinanaloga

OP Operation

oGTT oraler Glukose-Toleranz-Test

Ρ Pituitary (Hypophyse)

PA Pituitary adenoma (Hypophysenadenom) **PBS** Phosphat-Buffered Saline (Phosphatpuffer)

"Tween" = Polyaethylenglycolsorbitanmonolaurat -PBS-T

Puffer

**PCR** Polymerase-chain-reaction

**PRL** Prolaktin (mammotropes Hormon)

Responder = Patienten, welche einen Abfall des R

GH-MW >50% oder einen Rückgang des TV >20%

zeigten

**RIA** Radioimmunoassay Raumtemperatur (24 °C) RT

RT-PCR real-time polymerase-chain-reaction

subcutan S.C.

Sodium-Dodecyl-Sulfat SDS SE Standarderror, -abweichung

single photon emissions computer tomographie **SPECT** Somatostatin = SRIF (Somatotropin-releasing-SS

inhibiting factor)

SSA Somatostatinanalogon Somato-Statin-Rezeptor sst

**TBPS** Tris-phosphate buffered saline TRH Thyreotropin-Releasing Hormone

TV Tumorvolumen

TVNR Tumor Volumen Non Responder TVR Tumor Volumen Responder

VK Variationskoeffizient

vs versus

WGA Weizenkeim-Sepharose-Kügelchen

z.B. zum Beispiel

μg Mikrogramm (10<sup>-6</sup>) μm Mikrometer (10<sup>-6</sup>)

### 8. Literaturverzeichnis

- 1. Nabarro JDN. Acromegaly. Clin Endocrinol (Oxf.) 1987 Apr;26(4):481-512.
- 2. Bengtsson B-Å, Edén S, Ernest I, Odén A, Sjögren B. Epidemiology and long-term survival in acromegaly. Acta Med Scand 1988;223:327-335.
- 3. Etxabe J, Gaztambide S, Latorre P, Vazquez JA. Acromegaly: An epidemiological study. J Endocrinol Invest 1993;16:181-187.
- 4. Quabbe HJ und Mitarbeiter. Interdisziplinäres Vorgehen bei Akromegalie und Gigantismus.UNI-MED Verlag AG Bremen 2003; 15-16, 63-66, 70-71, 95-98, 104-108, 112-113,1. Auflage
- 5. Jenkins PJ. Cancers associated with acromegaly. Neuroendocrinology 2006; 83(3-4):218-23
- 6. Lombardi G, Galdiero M, Auriemma R, Pivonello R, Colao A. Acromegaly and the Cardiovaskular System. Neuroendocrin 2006;83:211-217
- 7. Ituarte EA, Petrini J, Hershman JM. Acromegaly and colon cancer. Ann Intern Medm 1984;101:627-628.
- 8. Ezzat S, Melmed S. Are Patients with Acromegaly at Increased Risk for Neoplasia? J Clin Endocrinol Metab 1991;72:245-249
- 9. Klein I. Acromegaly and cancer. Ann Intern Med 1984;101:706-707.
- 10. Bates AS, Van't Hoff W, Jones JM, Clayton RN. Does treatment of acromegaly affect life expectancy? Metabolism 1995;44 (Suppl1):1-5.
- 11. Quabbe H-J, Plöckinger U. Acromegaly: Clinical findings and endocrinology. In: Landolt AM, Vance ML, Reilly PL (eds.). Pituitary Adenomas: Biology, Diagnosis and Treatment. Churchill Livingstone, New York 1996;85-100.
- Brandi ML, Marx SJ, Aurbach GD, Fitzpatrick LA. Familial multiple endocrine neoplasia type I: A new look at pathophysiology. Endocrine Rev 1987;8:391-405.
- Chanson P, Dib A, Visot A, Derome PJ. McCune-Albright syndrome and acromegaly: Clinical studies and responses to treatment in five cases. Eur J Endocrinol 1994;131:229-234.
- 14. Melmed S.: Medical Progress: Acromegaly. NEJM 2006;355(24):2558-2573
- Colao A, Cannavo S, Marzullo P, Pivonello R, Squadrito S, Vallone G, Almoto B, Bichisao E, Trimarchi F, Lombardi G. Twelve months of treatment with octreotide-LAR reduces joint thickness in acromegaly. Eur J Endocrinol 2003;148(1):31-8
- 16. Gnjidic Z, Ivekovic R, Rumboldt Z, Malenica M, Vizner B, Berkovic M. Chiasma syndrome in acromegalic patients—correlation of neuroradiologic and neuroopthalmologic findings. Coll Antropol. 2002;26:601-608.
- 17. von Werder. Klinische Neuroendokrinologie. Springer Verlag 2005; 12-14, 101,104, 134-159, 2.Aufl.
- 18. Abdolvahab-Emminger H. Physikum EXAKT. Thieme Verlag Stuttgart:1997;887-888
- 19. Blum WF. Functional Endocrinologic Diagnostics in Children and Adolescents, Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins. J&J-Verlag, Mannheim 1992:102-117
- Frisch H, Waldhauser F. Functional Endocrinologic Diagnostics in Children and Adolescents, Diagnosis of Growth Hormone Excess. J&J-Verlag, Mannheim 1992:118-126
- 21. Hall JE, Nieman LK. Handbook of Diagnostic Endocrinology. Humana Press Totowa, New Jersey 2003; 59-61
- 22. van der Lely, Hutson et al. Long-term treatment of acromegaly with pegvisomant, a growth hormone receptor antagonist. Lancet. 2001:4;358(9295):1743-4.
- 23. Duncan E, Wass JAH. Investigation protocol: Acromegaly and its investigation. Clinical Endocrinology 1999;50:285-293
- 24. Melmed S, Jackson I, Kleinberg D, Klibanski A. Current treatment guidelines for acromegaly. J Clin Endocrinol Metab 1998;83:2646-2652
- 25. Klibanski A, Zervas NT. Diagnosis and Management of Hormone-Sectreting Pituitary Adenomas. N Engl J Med 1991;324:822-829

- 26. Giustina A, Barkan A, Casanueva F-F, Cavagnini F, Frohmann L, Ho K, Veldhuis J, Wass J, von Werder K, Melmed S. Criteria for Cure of Acromegaly: A Consensus Statement. J of Clin Endocrin & Metab 2000;85(2):526-529
- 27. Classen, Diehl, Kochsiek: Innere Medizin. Urban & Fischer Verlag, München.2004:1435-1438,5.Aufl.
- 28. Oeckler R, Fink U, Müller OA, v.Werder K. Neue Methoden in Diagnostik und Therapie der Hypophysenadenome Kernspintomographie und Laserchirurgie. Aktuelle Endokrinologie und Stoffwechsel 1990;11:6-10
- 29. Arosio M, Ronchi CL, Epaminonda P, Di Lembo S, Adda G. New therapeutic options for acromegaly. Minerva Endocrinol 2004; 29:225-39
- 30. Freda PU, Wardlanw SL, Post KD 1998 Long-term endocrinological follow-up evaluation in 115 patients who underwent transspheniodal surgery for acromegaly. J Neurosurg 89:353-358
- 31. Schmitz P. Hypophysenadenome Katamnestische Untersuchungen an 100 Fällen mit besonderer Berücksichtigung der suprasellären Ausdehnung und der Rezidivhäufigkeit. Diss. Mainz, 1974
- 32. Carrasco C, Veliz J, Rojas D, Wohllk N. Results of surgical treatment for acromegaly in 53 patients. Rev Med Chil 2006;134(8):989-96
- 33. Shimon I, Cohen ZR, Ram Z, Hadani M. Transspenoidal surgery for acromegaly: endocrinological follow-up of 98 patients. Neurosurgery 2001;48:1239-1243
- 34. Fahlbusch R, Buchfelder M, Kreutzer J, Nomikos P, 2001 Surgical Management of Acromegaly. Wass J (Hrsg.), BioScientifica, Bristol,pp 41-47
- 35. Reincke M, Petersenn S, Buchfelder M, Gebert B, Skrobek-Engel G, Franz H, Lohmann R, Quabbe HJ. The german acromegaly registry: description of the database and initial results. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2006;114(9):498-505
- 36. Colao A, Ferone D, Cappabianca P, del Basso De Caro ML, Marzullo P, Ponticelli A, Alfieri A, Merla B, Cali A, de Divitiis E, Lombardi G. Effect of octreotide pretreatment on surgical outcome in acromegaly. J Clin Endocrinol Metab. 1997;82(10):3308-14
- 37. Fahlbusch R, Honegger J, Buchfelder M. Surgical management of acromegaly. In: Melmed S (ed) Acromegaly. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, Vol 21(3). WB Saunders, Philadelphia 1992, pp 669-995
- 38. Quabbe, H.-J., Schaffert, S.: Akromegalie, Diagnose und Therapie heute. Dokumentation einer klinisch-wissenschaftlichen Fallkonferenz, Freiburg, 1998
- 39. Lamberts SWJ, van der Lely A, de Herder WW. Clinical and Medical Diagnosis of Acromegaly. Metabol 1995;44(Suppl 1):15-17
- 40. Farooqi S, Bevan JS, Sheppard MC et al. The Therapeutic Value of Somatostatin and its Analogues. Pituitary 1999;2:79-88
- 41 Reubi JC, Landolt AM. The growth hormone responses to octreotide in acromegaly correlate with adenoma somatostatin receptor status. J Clin Endocrinol Metab 1989;68:844-850
- 42. Lamberts SW, Krenning EP, Reubi JC. The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors. Endocr Rev 1991;12:450-482
- 43. Guillermet-Guibert J, Lahlou H, Cordelier P, Bousquet C, Pyronnet S, Susini C.Physiology of Somatostatin receptors. J Endocrinol Invest. 2005:28(11 Suppl):5-9
- 44. Hofland LJ, Liu Q, van Koetsveld PM, Zuijderwijk J, van der Ham F, de Krijger RR, Schonbrunn A, Lamberts SWJ. Immunhistochemical Detection of Somatostatin Receptor Subtypes sst1 and sst2A in Human Somatostatin Receptor Positive Tumors. J of Clin Endocrinol and Metab. 1999;84:2775-780
- 45. Tulipano G, Bonfanti C, Milani G, Billeci B, Bollati A, Cozzi R, Maira G, Murphy WA, Poiesi C, Turazzi S, Giustina A. Differential inhibition of growth hormone secretion by analogs selective for somatostatin receptor subtypes 2 and 5 in human growth-hormone-secreting adenoma cells in vitro. Neuroendocrinology 2001;73:344-351
- 46. Lamberts SWJ, van der Lely AJ, Hofland LJ. New somatostatin analogs: will they fulfil old promises? Eur J Endocrinol. 2002;146:2646-2652

- 47. Miller G, Alexander J, Bikkal H, Katznelson L, Zervas N, Kljbanski A. Somatostatin Receptor Subtype Gene Expression in pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metab 1995;80(4):1386-1392
- 48. Thodou E, Kontogeorgos G, Theodossiou D, Pateraki M.Mapping of somatostatin receptor types in GH or/and PRL producing pituitary adenomas. J Clin Pathol. 2006 Mar;59(3):274-9
- 49. Greenman Y, Melmed S. Expression of three Somatostatin receptor subtypes in pituitary adenomas: evidence for preferential SSTR5 expression in the mammosomatotroph I ineage. J Clin Endocrinol Metab. 1994;79(3):724-9
- 50. Bertrand J, Rappaport R, Sizonenko P. Pediatric Endocrinology: physiology, pathophysiology & clinical aspects. Williams & Wilkins Verl., Baltimore: 1993, 2. Aufl.
- 51. Greten Heiner: Innere Medizin. Thieme Verlag Stuttgart. 2005:491-494, 12.Aufl.
- 52. Amato G, Mazziotti G, Rotondi M, Iorio S, Doga M, Sorvillo F, Manganella G, Di Salle F, Giustina A, Carella C. Long-term effects of lanreotide SR and octreotide LAR on tumor shrinkage and GH hypersecretion in patients with previously untreated acromegaly. Clin Endocrinol (Oxf) 2002;56:65-71
- 53. Freda PU, Katznelson L, van der Lely AJ, Reyes CM, Zhao S, Rabinowitz D. Long-acting somatostatin analog therapy of acromegaly: a meta-analysis. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:4465-4473
- 54. Racine MS, Barkan AL. Medical management of growth hormone-secreting pituitary adenomas. Pituitary 2002;5:67-76
- 55. Colao A, Ferone D, Marzullo P, Cappabianca P, Cirillo S, Boerlin V, Lancranjan I, Lombardi G. Long-term effects of depot long-acting somatostatin analog octreotide on hormone levels and tumor mass in acromegaly. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:2779-2786
- 56. Ducrase MCR, Tauber JP, Tourre A, Bonafe A, Babin Th, Tauber MT, Harris AG, Bayard F. Shrinkage of a growth hormone-producing pituitary tumor by continuous subcutaneous infusion of the Somatostatin analog SMS 201-995. J Clin Endocrinol Metab. 1987;65:1042-1046
- 57. Gola M, Bonadonna S, Mazziotti G, Amato G, Giustina A. Resistance to somatostatin analogs in acromegaly: an evolving concept? J Endocrinol Invest 2006;29:86-93
- 58. Grass P, Marbach P, Bruns C, Lancranjan I. Sandostatin LAR in Acromegaly. Metabol 1996;45(8):27-30
- 59. Colao A, Pivonello R, Rosato F, Tita P, De Menis E, Barreca A, Ferrara R, Mainini F, Arosio M, Lombardi G. First-line octreotide-LAR therapy induces tumor shrinkage and controls hormone exces in patients with acromegaly: results from an open, prospective, multicentre trial. Clin Endocrinol 2006;64(3):342-51
- 60. Freda PU. Somatostatin analogs in acromegaly. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87:3013-3018
- 61. Calao A, Pivonello R, Auriemma S, Briganti F, Galdiero M, Tortora F, Caranci F, Cirillo S, Lombardi G. Predictors of Tumor Shrinkage after Primary Therapy with Somatostatin Analogs in Acromegaly: A Prospective Study in 99 Patients. J Clin Endocrinol & Metabol. 2006;91(6):2112-2118
- 62. Losa M, Mortini P, Urbaz L, Ribotto P, Castrignano T, Giovanelli M. Presurgical treatment with somatostatin analogs in patients with acromegaly: effects on the remission and complication rates. J Neurosurg 2006;104(6):899-906
- 63. Lee Vance, M., Harris, A.G.: Long-term Treatment of 189 Acromegalic Patients with the Somatostatin Analog Octreotide. Arch. Intern. Med. 1991;151:1573-1578
- 64. Newman CB, Melmed S, Snyder PJ, Young WF, Boyajy LD, Levy R, Stewart WN, Klibanski A, Molitch ME, Gagel RF, Boyd, AE, Sheeler L, Cook D, Malarkey WB, Jackson I, Lee Vance M, Thorner MO, Ho PJ, Jaffe CA, Frohman LA, Kleinberg DL. Safety and Efficacy of Long Term Octreotide Therapy of Acromegaly: Results of a Multicenter Trial in 103 Patients A Clinical Research Center Study. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1995;Vol.80, No.9:2768-2775

- 65. Baldelli R, Colao A, Razzore P et al. Two-Year Follow-Up of Acromegalic Patients treated with Slow Release.Lanreotide (30 mg). J Clin Endocrinol Metab 2000;5:4099-4103
- 66. Jaffe CA, Barkan AL. Treatment of acromegaly with dopamine agonists. In: Melmed S (ed.).Acromegaly. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America. WB Saunders, Philadelphia 1992;21:713-735
- 67. van der Lely AJ, Hutson RK, Trainer PJ, Besser GM, Barkan AL, Katznelson L, Klibanski A, Herman-Bonert V, Melmed S, Vance ML, Freda PU, Stewart PM, Friend KE, Clemmons DR, Johannsson G, Stavrou S, Cook DM, Phillips LS, Strasburger CJ, Hackett S, Zib KA, Davis RJ, Scarlett JA, Thorner MO. Long term treatment of acromegaly with pegvisomant, a growth hormone receptor antagonist. Lancet 2001 Nov 24;358(9295):1754-9
- 68. Engenhart-Cabillic R, Kocher M, Müller R-P, Voges J, Sturm V, Jockhövel F, Fahlbusch R, Mokry M, Quabbe H-J. Leitlinien zur Strahlentherapie von Hypophysenadenomen. Dtsch med Wschr 1999;124:1148-1152
- 69. Jackson I-M-D, Noren G. Role of Gamma Knife Radiosurgery in Acromegaly. Pituitary 1999;2:71-77
- 70. Gutt B, Hatzack C. et al. Conventional pituitary irradiation is effective in normalising plasma IGF-I in patients with acromegaly. Eur J Endocrinol 2001;144:109-116
- 71. Lundin P, Pedersen F. Volume of pituitary macroadenomas: Assessment by MRI J Comput Assist Tomogr 1992;16:519-528
- 72. Lothar Thomas. Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt / Main 1998:143-145, 5. Auflage
- 73. Quabbe H-J, Müller O-Ā, Oelkers W, Willig RP. Rationelle Diagnostik in der Endokrinologie einschließlich Diabetologie und Stoffwechsel, Hypothalamus und Hypophyse. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1993:1-41
- 74. Lubert Stryer. Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford 1996:63-65, 4. Auflage
- Mundschenk J, Unger N, Schulz S, Höllt V, Schulz S, Steinke R, Lehnert H. Somatostatin Receptor Subtypes in Human Pheochromocytoma: Subcellular Expression Pattern and Functional Relevance for Octreotide Scintigraphy. J of Clin Endocrinol & Metab 2003;88 (11):5150-5157
- 76. Horst Ibelgaufts. Gentechnologie von A bis Z.VHC Verlagsgesellschaft mbH 1993:13-14, Studienausgabe
- 77. Schulz S, Schulz S, Schmitt J, Wiborny D, Schmidt H, Olbricht S, Weise W, Roessner A, Gramsch C, Hollt V. Immunocytochemical detection of somatostatin receptors sst1, sst2A, sst2B, and sst3 in paraffin-embedded breast cancer tissue using subtype-specific antibodies. Clin Cancer Res.1998;4(9):2047-52
- 78. Schulz S, Pauli SU, Schulz S, Händel M, Dietzmann K, Firsching R, Höllt V. Immunohistochemical Determination of Five Somatostatin Receptors in Meningeoma Reveals Frequent Overexpression of Somatostatin Receptor Subtype sst<sub>2A</sub>. Clinical Cancer Research 2000;6:1865-1874
- 79. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-685
- 80. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA.1979 Sept;76(9):4350-4
- 81. Kulaksiz H, Eissele R, Rössler D, Schulz S, Höllt V, Cetin Y, Arnold R. Identification of Somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3, and 5 in neuroendocrine tumors with subtype specific antibodies.Gut 2002;50:52-60
- 82. Lamberts SWJ, van der Lely AJ et al. Octreotide. N Engl J Med 1996;334:246-252
- 83. van der Lely AJ, Herder et al. New medical treatment for acromegaly. Pituitary 1999;2:89-92

- 84. Schaer JC, Waser B, Mengod G, Reubi JC. Somatostatin receptor subtypes sst<sub>1</sub>, sst<sub>2</sub>, sst<sub>3</sub> and sst<sub>5</sub> expression in human pituitary, gastroentero-pancreatic and mammary tumors: comparison of mRNA analysis with receptor autoradiography. Int J Cancer 1997;70(5):530-7
- 85. Hofland HJ, Lamberts SW. Somatostatin receptors in pituitary function, diagnosis and therapy. Front Horm Res 2004;32:235-52
- 86. Jaquet P, Saveanu A, Gunz G, Fina F, Zamora AJ, Grino M, Culler MD, Moreau JP, Enjalbert A, Ouafik LH. Human somatostatin receptor subtypes in acromegaly: distinct patterns of messenger ribonucleic acid expression and hormone suppression identify different tumoral phenotypes. J Clin Endocrinol Metab. 2000;85(2):781-92
- 87. Plöckinger U, Bäder M, Hopfenmüller W, Sager W, Quabbe HJ. Results of somatostatin receptor scintigraphy do not predict pituitary tumor volume- and hormone-response to octreotide therapy and do not correlate with tumor histology. Eur J of Endocrinol. 1997;136:369-376
- 88. Acosta-Gómez MJ, Muros MA, Llamas-Elvira JM, Ramirez A, Ortega S, Sabatel G, Ramos C, de la Riva-Aguilar A. The role of somatostatin receptor scintigraphy in patients with pituitary adenoma or post-surgical recurrent tumors. British Journal of Radiology. 2005;78:110-115
- 89. Rieger A, Rainov NG, Elfrich C, Klaua M, Meyer H, Lautenschlager C, Burkert W, Mende T.Somatostatin receptor scintigraphy in patients with pituitary adenoma. Neurosurg Rev 1997;20(1):7-12
- 90. Reubi JC, Landolt AM. The growth hormone response to octreotide in acromegaly correlate with adenoma somatostatin receptor status. J Clin Endocrinol Metab.1989;68(4):844-50
- 91. Quabbe HJ, Plöckinger U. Dose-response study and long term effect of the somatostatin analog octreotide in patients with therapy-resistant acromegaly. J Clin Endocrinol Metab. 1989;68(5):873-81
- 92. Pfeiffer M, Koch T, Schroder H, Klutzny M, Kirscht S, Kreienkamp HJ, Hollt V, Schulz S. Homo- and heterodimerization of somatostatin receptor subtypes. Inactivation of sst(3) receptor function by heterodimerization with sst(2A). J Biol Chem 2001;276:14027-14036
- 93. Schulz S, Schmitt J, Quednow C, Roessner A, Weise W. Immunohistochemical detection of somatostatin receptors in human ovarian tumors. Gynecol Oncol 2002;84:235-240
- 94. Parkinson C, Renehan AG et al. Gender and age influence the relationship between Serum GH and IGF-I in patients with acromegaly. Clin Endocrinol (Oxf) 2002;57(1):59-64
- 95. Clemmons DR, Underwood LE et al. Estradiol treatment of acromegaly. Reduction of immunoreactive somatomedin-C and improvement in metabolic status. Am J Med 1980;69(4):571-5
- 96. Bates AS, Van't Hoff W et al. An audit of outcome of treatment in acromegaly. Q J Med 1993;86(5):293-9
- 97. Cozzi R, Attanasio R et al. Treatment of acromegaly with SS analogues: should GH and IGF I target levels be lowered to assert a tight control of the disease? J Endocrinol Invest 2004;27(11):1040-7
- 98. Cardim HJ, Lopes CM et al. The insulin-like growth factor-I system and hormone replacement therapy. Fertil Steril 2001;75(2):282-7
- 99. Brabant G, von zur Muhlen A et al. Serum insulin-like growth factor I reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system: results from a multicenter study. Horm Res 2003;60(2):53-60
- 100. Holly JM, Cotterill AM et al. Inter-relations between growth hormone, insulin, Insulin like growth factor-I (IGF-I), IGF-binding protein-1 (IGFBP-1) and sex hormone-binding globulin in acromegaly. Clin Endocrinol (Oxf) 2001;34(4):275
- 101. Reubi JC, Waser B, Schaer JC, Laissue JA. Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. Eur J Nucl Med 2001;28:836-846

- 102. Jaquet P, Saveanu A, Gunz G, Fina F, Zamora AJ, Grino M, Culler MD, Moreau JP, Enjalbert A, Ouafik LH. Human somatostatin receptor subtypes in acromegaly: distinct patterns of messenger ribonucleic acid expression and hormone suppression identify d ifferent tumoral phenotypes. J Clin Endocrinol Metab 2000;85:781-792
- 103. Corbetta S, Ballare E, Mantovani G, Lania A, Losa M, Di Blasio AM, Spada A. Somatostatin receptor subtype 2 and 5 in human GH-secreting pituitary adenomas: analysis of gene sequence and mRNA expression. Eur J Clin Invest 2001;31:208-214
- 104. Panetta R, Patel YC. Expression of mRNA for all five human somatostatin receptors (hSSTR1-5) in pituitary tumors. Life Sci. 1995;56(5):333-42
- 105. Papotti M, Bongiovanni M, Volante M, Allia E, Landolfi S, Helboe L, Schindler M, Cole SL, Bussolati G. Expression of somatostatin receptor types 1-5 in 81 cases of gastrointestinal and pancreatic endocrine tumors. A correlative immunohistochemical and reverse-transcriptase polymerase chain reaction analysis. Virchows Arch 2002;440:461-475
- 106. Saveanu A, Gunz G, Dufor H, Caron P, Fina F, Ouafik L, Culler MD, Moreau JP, Enjalbert A, Jaquet P. BIM-23244, a Somatostatin receptor subtype 2- and 5-selective analog with enhanced efficancy in suppressing growth hormone (GH) from octreotide-resistant human GH-secreting adenomas. J Clin Endocrinol Metab 2001;86(1):140-5
- 107. Hofland LJ, van der Hoek J, van Koetsveld PM, de Herder WW, Waaijers M, Sprij-Mooij D, Bruns C, Weckbecker G, Feelders R, van der Lely AJ, Beckers A, Lamberts SW. The novel somatostatin analog SOM230 is a potent inhibitor of hormone release by growth hormone- and prolactin-secreting pituitary adenomas in vitro. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:1577-1585
- 108. Taboada GF, Luque RM, Bastos W, Giumaraes RF, Mercandos JB, Chimelli LM, Fontes R, Mata PJ, Filho PN, Carvalho DP, Kineman RD, Gadelha MR. Quantitative analysis of Somatostatin receptor subtype (SSTR1-5) gene expression levels in somatotropinomas and non-functioning pituitary adenomas. Eur J Endocrinol 2007;156:65-74
- 109. Nielsen S, Mellemkjaer S, Rasmussen LM, Ledet T, Olsen N, Bojsen-Moller M, Astrup J, Weeke J, Jorgensen JO. Expression of somatostatin receptors on human pituitary adenomas in vivo and ex vivo. J Endocrinol Invest 2001;24:430- 437
- 110. Shimon I, Yan X, Taylor JE, Weiss MH, Culler MD, Melmed S. Somatostatin- receptor (SSTR) subtype-selective analogues differentially suppress in vitro growth hormone and prolactin in human pituitary adenomas. Novel potential therapy for functional pituitary tumors. J Clin Invest 1997;100:2386-2392
- 111. Shimon I, Taylor JE, Dong JZ, Bitonte RA, Kim S, Morgan B, Coy DH, Culler MD, Melmed S. Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures. Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation. J Clin Invest 1997:99:789-798
- 112. Ren SG, Taylor J, Dong J, Yu R, Culler MD, Melmed S. Functional association of somatostatin receptor subtypes 2 and 5 in inhibiting human growth hormone secretion. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:4239-4245
- 113. Petersenn S. Efficacy and limits of Somatostatin analogs. J Endocrinol Invest 2005;28(11Suppl):53-7
- 114. Sharma K, Patel YC, Srikant CB. Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. Mol Endocrinol. 1996;10(12):1688-96
- 115. Losa M, Ciccarelli E, Mortini P, Barzaghi R, Gaia D, Faccani G, Papotti M, Mangili F, Terreni MR, Camanni F, Giovanelli M. Effects of octreotide treatment on the proliferation and apoptotic index of GH-secreting pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metab 2001:86:5194-5200
- 116. Lamberts SW, de Herder WW, Hofland LJ. Somatostatin analogs in the diagnosis and treatment of cancer. Trends Endocrinol Metab 2002;13:451-457
- 117. George SR, Kovacs K, Asa SL, Horvath E, Cross EG, Burrow GN. Effect of SMS 201-995, a long-acting somatostatin analogue, on the secretion and morphology of a pituitary growth hormone cell adenoma. Clin Endocrinol (Oxf) 1987;26:395-405

- 118. Ferrante E, Pellegrini C, Bondioni S, Peverelli E, Locatelli M, Gelmini P, Luciani P, Peri A, Mantovani G, Bosari S, Beck-Peccoz P, Spada A, Lania A.Octreotide promotes apoptosis in human somatotroph tumor cells by activating somatostatin receptor type 2. Soc for Endocrinol 2006;13(3):955-962
- 119. Casarini AP, Pinto EM, Jallad RS, Giorgi RR, Giannella-Neto D, BronsteinMD.
  Dissociation between tumor shrinkage and hormonal response during somatostatin analog treatment in an acromegalic patient: Preferential expression of Somatostatin receptor subtype 3. J Endocrinol Invest 2006;29(9):826-30
- 120. Jaquet P, Gunz G, Saveanu A, Barlier A, Dufour H, Taylor J, Dong J, Kim S, Moreau JP, Culler MD. BIM-23A760, a chimeric molecule directed towards somatostatin and dopamine receptors, vs universal somatostatin receptors ligands in GH-secreting pizuitary adenomas partial responders to octreotide. J Endocrinol Invest. 2005;28(11 Suppl):21-7
- 121. Shimon I, Rubinek T, hadani M, Alhadef N. PTR-3173 (somatoprim), a novel somatostatin analog with affinity for somatostatin receptors 2,4 and 5 is a potent inhibitor of human GH secretion. J Endocrinol Invest. 2004 Sep;27(8):721-7)
- 122. van der Hoek J, van der Leji AJ, Feelders RA, de Herder WW, Uitterlinden P, Poon KW, Boerlin V, Lewis I, Krahnke T, Hofland LJ, Lamberts SW. The somatostatin analogue SOM230, compared with octreotide, induces differential effects in several metabolic pathways in acromegalic patients. Clin Endocrinol (Oxf). 2005 Aug;63(2):176-84
- 123. Batista DL, Zhang X, Gejman R, Ansell PJ, Zhou Y, Johnson SA, Swearingen B, Hedley-Whyte ET, Stratakis CA, Klibanski A. The effect of SOM230 on cell proliferation and adrenocorticotropin secretion in human corticotroph pituitary adenomas. J Clin Endocrinol Metab. 2006 Nov;91(11):4482-8

## **Danksagung**

Ein recht herzlicher Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. U. Plöckinger für die Überlassung des Themas und die stete Bereitschaft zur Mithilfe.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die zuverlässige Durchführung der Färbungen der Somatostatin-Rezeptor-Subtypen am Pharmakologischen Institut in Magdeburg. Hier wird der MTA D. Maier und besonders Herrn Prof. Dr. S. Schulz für die Auswertung der erhaltenen Färbungen und die ständige Möglichkeit zur Kooperation gedankt.

Für die zur Verfügung gestellten Paraffinblöcke danke ich Prof. Dr. med. W. Saeger aus dem Institut für Pathologie in Hamburg, Prof. Dr. med. H. Stein aus dem Institut für Pathologie der Charité am Campus Benjamin Franklin, Prof. Dr. W. Brück des Institutes für Neuropathologie der Georg-August-Universität Göttingen und Dr. R. Buslei aus dem Lehrstuhl der Neuropathologie in Erlangen.

Dank auch Frau I. Klasen und Frau S. Wirth aus dem Interdisziplinärem Stoffwechsel-Centrum Charité, Campus Virchow Klinikum, welche mir tatkräftig zur Seite standen bei der Beschaffung der Paraffinblöcke.

Zuletzt sei ganz herzlich meinen Eltern, Freunden und Verwandten gedankt, welche mir immer wieder Mut gaben und ein offenes Ohr zeigten. Hier fand ich stets die Gelegenheit neue Energie zu schöpfen und die Kraft, mich weiter mit dieser Arbeit zu beschäftigen, so dass diese hier vorliegende Schrift entstehen konnte.

# Erklärung

Ich, Susann Albrecht, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

"Selektiver Verlust des Somatostatin-Rezeptor-Subtyp 2 in Octreotid-resistenten Wachstumshormon-sezernierenden Hypophysenadenomen" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

nterscl	hrift
I	16120

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.