

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Die Expression der Somatostatin-Rezeptoren 1, 3, 4 und 5 beim Magen- und
Kolonkarzinom**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von.....Franziska Schauer
aus.....Magdeburg
Magdeburg.....2010

Dokumentationsblatt

Bibliografische Beschreibung:

Schauer, Franziska: Die Expression der Somatostatin-Rezeptoren 1, 3, 4 und 5 beim Magen- und Kolonkarzinom; - 2010; - 89 Bl. : 10 Abb., 19 Tab.

Kurzreferat

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Immunhistochemie das Expressionsmuster der Somatostatin-Rezeptoren (SSTR) 1, 3, 4 und 5 in den Adenokarzinomen des Magens von 181 Patienten und der SSTR 1, 3 und 4 in den Adenokarzinomen des Kolons untersucht und mit den korrespondierenden gesunden Geweben beider Organe verglichen. In den Tissue Microarrays waren die Rezeptor-Subtypen in der Rangfolge SSTR 1 > 5 > 3 > 4 in den Drüsen der tumorfreien Magenschleimhaut hochsignifikant stärker als in den Tumorzellen der Adenokarzinome des Magens exprimiert gefunden worden. Weiterhin korrelierte die Expression von SSTR 1 und 5 mit der lokalen Tumorausbreitung (T-Stadium) und dem Differenzierungsgrad. Dabei ging eine niedrigere Expression mit einem jeweils höheren Stadium einher. Die Krypten des benignen Kolongewebes aus einem Kollektiv von 82 Kolonkarzinompatienten zeigten analog eine signifikant stärkere Expression der Rezeptor-Subtypen 1 und 4 als die Adenokarzinome des Kolons. Beide Rezeptoren ließen in den Adenokarzinomen keine weiteren Korrelationen erkennen. SSTR 3 war überdies in allen untersuchten Fällen des Kolons immunnegativ und grenzt sich damit klar vom Magenkarzinom ab.

I. Abkürzungsverzeichnis

A	Abb.	Abbildung
	ABC	Avidin Biotin Komplex
	AJCC	„american joint committee on cancer“
B	BRCA2	„breast cancer gene 2“
	bzw.	beziehungsweise
C	ca.	circa
	CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
	CDH1	Gen-Name vom Produkt E-Cadherin
	CHO-Zellen	Ovarialzellen chinesischer Hamster
	COX-2	Cyclooxygenase-2
D	dH ₂ O	deionisiertes Wasser
E	ECL	Enterochromaffin-ähnliche Zellen
	EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
F	FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
G	GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
	GPT	Guanosintriphosphat (kurz: G-Protein)
H	H. pylori	Helicobacter pylori
	HCL	Salzsäure
	HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolon-Karzinom-Syndrom
I	IARC	„international agency for research on cancer“
	IL	Interleukin
	ILG-F	„insulin like growth factor“
	IRS	Immunreaktivitätsscore
J	JÜR	Jahres-Überlebensrate
K	k.A.	keine Angaben
	kDa	Kilodalton
	Kor	Korrelationskoeffizient
M	M, mM, µM	Molar, Milimolar, Mikromolar
	MAPK	„mitogen-activated protein kinases“
	mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
N	NHE1	Na ⁺ /H ⁺ exchanger Isoform 1
P	PCR	Polymerasekettenreaktion
	PTP	Phosphotyrosin-Phosphatase
R	RKI	Robert Koch-Institut
	Rb-Protein	Retinoblastom-Tumorsuppressorprotein
	RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
	RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerasekettenreaktion
S	SRIF	„somatotropin release-inhibiting factor“
	SST	Somatostatin
	SSTA	Somatostatin-Analoga
	SSTR	Somatostatin-Rezeptor
	hSSTR	Humaner Somatostatin-Rezeptor
	rSSTR	Somatostatin-Rezeptor von Ratten
T	Tab.	Tabelle
	TMA	Tissue Microarray
	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	UICC	„Union Internationale Contre le Cancer“
W	WHO	Weltgesundheitsorganisation

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis.....	3
1. Einteilung.....	6
1.1. Magenkarzinom.....	6
1.1.1. Definition und Epidemiologie.....	6
1.1.2. Pathogenese und Risikofaktoren.....	7
1.1.3. Einteilung.....	11
1.2. Kolorektales Karzinom.....	14
1.2.1. Definition und Epidemiologie.....	14
1.2.2. Pathogenese und Risikofaktoren.....	16
1.2.3. Einteilung.....	20
1.3. Somatostatin und Somatostatin-Rezeptoren.....	23
1.3.1. SSTR 1.....	26
1.3.2. SSTR 2.....	26
1.3.3. SSTR 3.....	27
1.3.4. SSTR 4.....	28
1.3.5. SSTR 5.....	29
1.3.6. SSTR und maligne Erkrankungen.....	30
1.4. Aufgabenstellung.....	31
2. Material und Methoden.....	31
2.1. Patientenkollektiv.....	31
2.1.1. Charakterisierung des Patientenkollektivs – Magen.....	32
2.1.2. Charakterisierung des Patientenkollektivs – Kolon.....	33
2.2. Probenvorbereitung.....	35
2.2.1. Antikörper.....	35
2.2.2. Tissue Microarray.....	35
2.3. Immunhistochemische Färbungen.....	36
3. Auswertung.....	37
3.1. Lichtmikroskopische Auswertung.....	37
3.2. Statistische Methoden.....	38
4. Ergebnisse.....	39
4.1 Expression der Somatostatin-Rezeptoren im Magen.....	40
4.1.1. Expression von SSTR 1.....	41
4.1.2. Expression von SSTR 3.....	43
4.1.3. Expression von SSTR 4.....	44

4.1.4. Expression von SSTR 5.....	46
4.1.5. Statistische Auswertung – SSTR 1, 3, 4 und 5.....	47
4.2. Expression der Somatostatin-Rezeptoren im Kolon.....	50
4.2.1. Expression von SSTR 1.....	51
4.2.2. Expression von SSTR 3.....	52
4.2.3. Expression von SSTR 4.....	53
4.2.4. Statistische Auswertung – SSTR 1, 3, und 4.....	54
5. Diskussion.....	55
5.1. SSTR und das Magenkarzinom.....	56
5.2. SSTR und das kolorektale Karzinom.....	61
5.3. SSTR in der Diagnostik und Therapie.....	65
6. Zusammenfassung.....	67
 II. Literaturverzeichnis.....	 70
 III. Anhang.....	 81
 IV. Tabellenverzeichnis.....	 86
 V. Abbildungsverzeichnis.....	 86
 VI. Erklärung.....	 87
 VII. Lebenslauf.....	 88

1. Einleitung

1.1. Magenkarzinom

1.1.1. Definition und Epidemiologie

Das Magenkarzinom ist ein maligner epithelialer Tumor der Magenschleimhaut (Hamilton und Aaltonen 2000).

Weltweit steht es mit 934.000 neuen Fällen jährlich an vierter Stelle der häufigsten Karzinome und erreicht mit ca. 700.000 Todesfällen pro Jahr noch immer die zweitführende Position hinsichtlich Sterblichkeit durch eine maligne Grunderkrankung (Brenner et al. 2009, Boyle und Levin 2008). Sein Vorkommen zeigt große geografische Unterschiede. Annähernd 60% der Magenkarzinome kommen in den Entwicklungsländern und Asien vor. Zu den Hoch-Risiko-Gebieten mit >20/100.000 neuen Fällen pro Jahr zählen Ostasien (China, Japan), Osteuropa, Regionen von Zentral- und Südafrika und Südamerika. Niedrige Inzidenzen mit <10/100.000 Erkrankungsfällen sind in Südasien, Nord- und Ostafrika, Nordamerika, Australien und Neuseeland zu finden (Parkin et al. 2005).

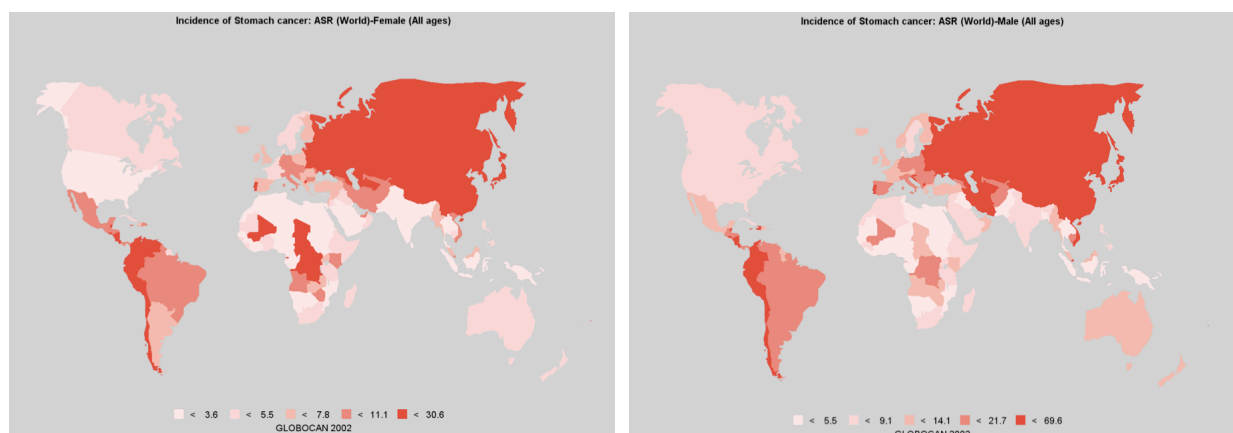


Abb.1.1.1.: Inzidenz des Magenkarzinoms: Frauen (links) und Männer (rechts), Globoscan 2002 (Boyle und Levin 2008)

In Deutschland liegt gemäß Schätzungen des Robert Koch-Institutes die Zahl der Neuerkrankungen bei ca. 19.000 Fällen jährlich und ist damit die fünfhäufigste

Krebserkrankung bei Männern und Frauen (Robert Koch-Institut 2008, Bollschweiler et al. 2009). Männer sind je nach Literaturangaben 1,2- bis 2,5-mal häufiger betroffen. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung befinden sich die meisten Patienten im Alter von 60 bis 80 Jahren (Mittel 62 Jahre). Erste Erkrankungsgipfel sind aber schon in der 3. bis 4. Lebensdekade beschrieben. Im Gegensatz zu vielen anderen Karzinomen, für welche auf Grund des therapeutischen Fortschrittes eine Verbesserung in der Prognose aufgezeigt werden konnte, besteht bei Patienten mit Magenkarzinomen trotz intensiver Forschung eine geringere Überlebensrate (Brenner et al. 2009). Die 5-JÜR außerhalb von Japan liegt bei ca. 23% (Coleman et al. 2003, Parkin et al. 2005). In Japan ist die Prognose mit 52% deutlich besser, da bereits seit den 60er Jahren intensive Screening-Untersuchungen mittels Fotofluoroskopie zur Früherkennung veranlasst wurden (Parkin et al. 2005).

Dass in den vergangenen Jahren trotzdem ein Rückgang der Mortalität erreicht werden konnte, ist vordergründig auf zwei Faktoren zurückzuführen. Nachweislich stehen hierbei diätetische Anpassungen und eine Reduktion der *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) Infektionen im Vordergrund (Boyle und Levin 2008). Eine interessante Hypothese für den Rückgang der Karzinome seit den 70er Jahren ist zudem die Einführung des Kühlschranks (Coggon et al. 1989, Alberts et al. 2003). Letzterer ermöglicht eine verbesserte Lebensmittelkonservierung mit dem Rückgang gesalzener, gepökelter, geräucherter und chemisch haltbar gemachter Lebensmittel sowie eine bessere Verfügbarkeit von frischem Obst und Gemüse (Roder 2002).

1.1.2. Pathogenese und Risikofaktoren

Das Magenkarzinom ist eine multifaktorielle Erkrankung, dessen Entstehung einem langjährigen Prozess unterliegt. Migrationsstudien deuten darauf hin, dass die zeitlichen Veränderungen und geografische Variabilität des Magenkarzinoms hinsichtlich Inzidenz und Mortalität durch Umwelt- und Lebensstilfaktoren beeinflusst werden. So besitzen Japaner,

die beispielsweise in die USA auswandern, in der Folgegeneration kein erhöhtes Risiko für ein Magenkarzinom (Crew und Neugut 2006).

In dem von P. Correa 1975 vorgestellten Modell wird die Entwicklung von Adenokarzinomen des intestinalen Typs erklärt. In dieser Kaskade werden phänotypische Veränderungen in einer sequenziellen Abfolge beschrieben, zu der die chronische Gastritis, Atrophie, intestinale Metaplasie und Dysplasie gehören (Correa 1996, 2004).

Der zweite nach Laurén eingeteilte diffuse Adenokarzinomtyp entwickelt sich dagegen zumeist unabhängig von der gastrischen Atrophie und intestinalen Metaplasie. Magenkarzinome dieser Art treten vornehmlich bei jüngeren Menschen auf und zeigen unter globalen Gesichtspunkten weniger Variabilität in ihrer Verteilung (Guilford et al. 1998, Enroth et al. 2000, Fox und Wang 2007, Konturek et al. 2009).

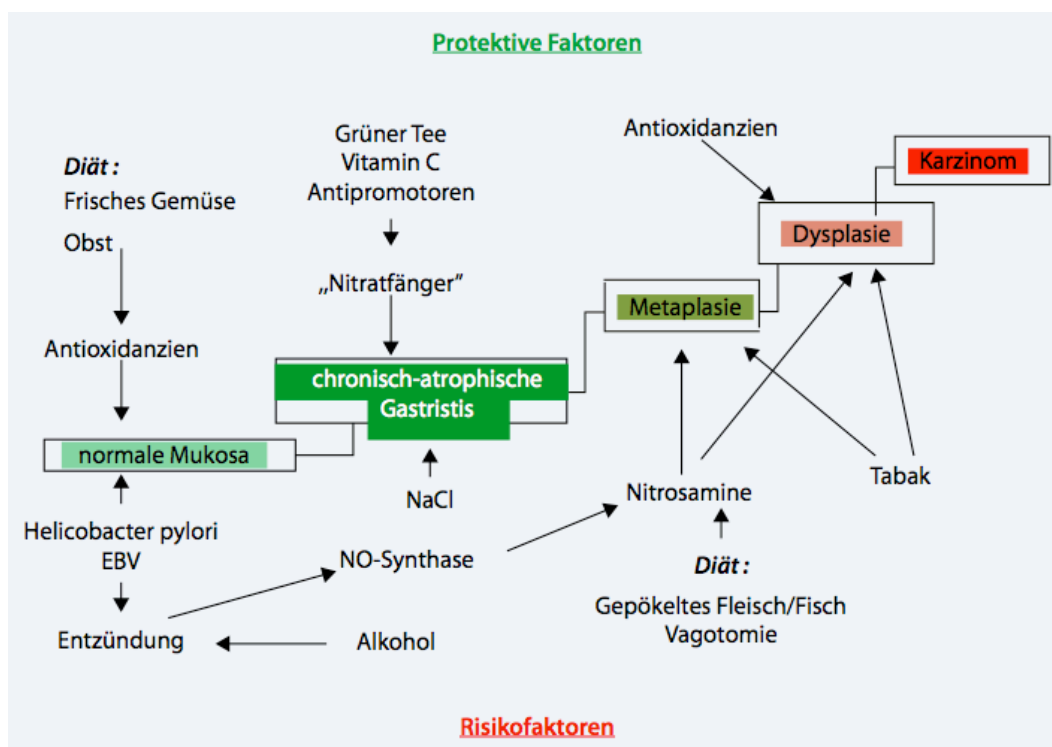


Abb.1.1.2.: Protektive Faktoren und Risikofaktoren für die Entstehung des Adenokarzinoms des Magens aus normaler Magenmukosa (Bollschweiler et al. 2009)

Ein wichtiger Pathogenitätsfaktor im karzinogenen Prozess ist *H. pylori*. 1984 postulierten Marshall und Warren erstmals den Zusammenhang von *H. pylori* Infektionen mit der

Entwicklung von Gastritiden und peptischen Ulzera, welche die Karzinomentstehung begünstigen können (Marshall und Warren 1984). Bereits 1994 erhob die *International Agency for Research on Cancer* (IARC) das gramnegative Bakterium zum Karzinogen erster Ordnung (IARC, WHO, 1994, Boyle und Levin 2008). Fallkontrollierte Studien der 90er Jahre beschrieben ein 2,1 bis 16,7 fach größeres Risiko für die Magenkarzinomentwicklung bei H. pylori infizierten Patienten. Eine prospektive japanischen Studie untermauerte dieses erhöhte Risiko, wonach 2,9% der infizierten Teilnehmer nach Jahren Magenkarzinome entwickelten, während sich kein einziger Magentumor bei nichtinfizierten Personen finden ließ (Miehlke et al. 1997, Uemura et al. 2001, Crew und Neugut 2006).

Das Zusammenspiel von Bakterium, Wirt und Umwelt bestimmt dabei das Bild der Infektion. Mehrfach wird eine chronische Gastritis verursacht. Diese geht jedoch mit intragastrischen Veränderungen, wie einer gesteigerten Zellproliferation einher und bildet die Voraussetzung für die Anhäufung genetischer Schäden. Spezifische Virulenzfaktoren, wie CagA, VacA (vacuolating toxin), BabA (blood group antigen binding protein) beim Keim und genetische Polymorphismen des Wirts, wie erhöhte Serumspiegel an proinflammatorischen Zytokinen (Interleukin-1 β bzw. Interleukin-8) sind für die Pathogenität und das Karzinomrisiko entscheidend (Crabtree et al. 1995, Tomb et al. 1997, Hamilton und Aaltonen 2000, El-Omar et al. 2003, Hohenberger und Gretschel 2003).

Ein Mechanismus umfasst eine VacA assoziierte Schädigung der Parietalzellen des Magens, die mit einer gesteigerten Gastrinsekretion reagieren. Die Hypergastrinämie bewirkt eine erhöhte Expression von COX-2 sowie eine verstärkte Ausschüttung verschiedener Wachstumsfaktoren und anti-apoptotischer Proteine. Während Gastrin eine Zellproliferation und Induktion der Angiogenese auslöst, führen Produkte des COX-2-Prostaglandinsystems zu einer Hemmung der Apoptose (Konturek et al. 2006, Brzozowski et al. 2006, Ito et al. 2008).

Der größte Teil der Magenkarzinome entsteht sporadisch. Bei etwa 10% der Fälle sind erbliche- und familiäre Häufungen bekannt, für deren Entstehung verantwortliche Gene aber

noch nicht vollständig identifiziert werden konnten. Das relative Risiko zu erkranken ist dabei umso höher, je mehr Familienmitglieder betroffen sind, und liegt im Mittel zwischen dem 1,5 bis 3,5 fachen. Für hereditäre diffuse Magenkarzinome können Keimbahnmutationen des E-Cadherin Gens (CDH-1) mit einer individuellen Penetranz von bis zu 40% nachgewiesen werden. Seltener sind hereditäre Magenkarzinome auf erbliche Syndrome wie das HNPCC, Peutz-Jeghers-Syndrom und die FAP zurückzuführen. Gänzlich untypisch wurden Magentumoren im Rahmen von familiären BRCA2-Mutationen beschrieben, welche primär für Mamma- und Ovarialkarzinome verantwortlich sind. In Japan sind Magenkarzinome als Ausdruck der familiären Polyposis coli aufgetreten, wogegen in Nordamerika Kolonkarzinome im Vordergrund dieses Krankheitsbildes stehen (Watson und Lynch 1993, Guilford et al. 1998, Hamilton und Aaltonen 2000, Jakubowska et al. 2002, Shimoyama et al. 2004, Yaghoobi et al. 2009).

Einen weiteren wichtigen ätiologischen Einfluss haben Ernährungsgewohnheiten. Während erhöhter Salzkonsum, Nitrite und Nitrosamine das Karzinomrisiko erhöhen, scheint der gesteigerte Verzehr von frischem Obst und Gemüse, von Antioxidantien wie Vitamin C, E und β -Carotin einen protektiven Effekt auf die Karzinogenese zu haben (Hamilton und Aaltonen 2000, Crew und Neugut 2006). Ascorbinsäure z.B. arbeitet als Fänger freier Radikale und schützt die Mukosa des Magens vor DNS-Schäden und einer potentiellen malignen Transformation (Drake et al. 1996). Im Sinne der Ernährung steht auch die Adipositas. Sie ist auf Grund des erhöhten Risikos für die gastroösophageale Refluxkrankheit sowie der einhergehenden Prädisposition für einen Barrett-Ösophagus für die Zunahme kardia-assoziiierter Adenokarzinome zu diskutieren (Chew und Neugut 2006, Corley et al. 2008).

Zigaretten- und Alkoholkonsum sind weitere häufig untersuchte Größen, allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen. Konsum- und Dosisumfang sowie die Kombination beider sind hierbei die Faktoren, die das Risiko der Karzinomentstehung entscheidend beeinflussen (Koizumi et al. 2004, Sjö Dahl et al. 2007, Steevens et al. 2009).

1.1.3. Einteilung

Das Magenkarzinom wird anhand verschiedener Kriterien klassifiziert. Unter anatomischen Gesichtspunkten kann man zwischen proximalen (cardia) und distalen (non-cardia) Magenkarzinomen unterscheiden. Aus endoskopischen Aspekten unterteilt man anhand unterschiedlicher Wachstumsmuster den vorgewölbten (I), erhöhten (IIa), flachen (IIb), vertieften (IIc) und exkavierten (III) Typ. Das makroskopische Erscheinungsbild dient als Grundlage der Klassifikation nach Borrmann, welche das polypös-exophytische (I), schüsselförmig-exulzierende (II), karzinomatös-flach ulzerierende (III) vom diffus infiltrierenden (IV) Wachstum differenziert.

Unter histologischen Gesichtspunkten sind 95% aller Magentumore Adenokarzinome. Die restlichen 5% entfallen auf Lymphome, Plattenepithelkarzinome, undifferenzierte Karzinome, Adenoakanthome und Leiomyosarkome. Histologisch sind die Klassifikationen der WHO und die nach Laurén am gebräuchlichsten. Die WHO unterscheidet tubulär, papillär, muzinös wachsende Adenokarzinome vom Siegelringzellkarzinom. Demgegenüber gliedert die Laurén-Klassifikation nach dem histopathologischen Wachstumsmuster und der Ausbreitungstendenz. Sie unterteilt den intestinalen Typ (gut differenzierten) und den diffusen Typ (wenig differenzierten). Mischformen aus beiden Typen, der sogenannte Mischtyp sind möglich. Auf der Grundlage des histopathologischen Differenzierungsgrades können gut, mäßig, gering und undifferenzierte Karzinome eingeteilt werden (Borrmann 1926, Laurén 1965, Hamilton und Aaltonen 2000).

Von weiterer Bedeutung sind Magenfrühkarzinome. Sie sind dadurch definiert, dass sie, unabhängig von der Flächenausdehnung und dem Lymphknotenstatus, nur bis zur Mukosa bzw. Submukosa der Magenwand reichen (Hamilton und Aaltonen 2000).

Die klinisch-pathologische Stadieneinteilung des Magenkarzinoms erfolgt mittels der TNM-Klassifikation. Das T-Stadium beschreibt das Primärtumorstadium, das N-Stadium den Metastasierungsstatus in regionäre Lymphknoten und das M-Stadium das Vorhandensein

von Fernmetastasen. Sie ist die Grundlage für die Stadieneinteilung der AJCC/UICC, welche hauptsächlich in der westlichen Welt ihre klinische Anwendung findet und eine evidenzbasierte Einteilung der Tumoren im Hinblick auf Therapiestrategien und prognostischer Bewertung ermöglicht (Kneif, Hünnerbein 2009).

Tab.1.1.3.a: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms (nach UICC, 6. Auflage 2002)

T – Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der Lamina propria
T1	Tumor infiltriert die Lamina propria oder Submukosa
T2a	Tumor infiltriert Muscularis propria
T2b	Tumor infiltriert Subserosa
T3	Tumor penetriert Serosa (viszerales Peritoneum), infiltriert ab nicht benachbarte Strukturen
T4	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen (Milz, Colon transversum, Leber, Zwerchfell, Pankreas, Bauchwand, Nebennieren, Dünndarm, Retroperitoneum, Dünndarm, Ösophagus)

N – Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-6 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 7-15 regionären Lymphknoten
N3	Metastasen in mehr als 15 regionären Lymphknoten

M – Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab.1.1.3.b: UICC Stadiengruppierung basierend auf der TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms (nach UICC, 6. Auflage 2002)

Stadium	T – Primärtumor	N – Regionäre Lymphknoten	M – Fernmetastasen
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T1	N1	M0
	T2a/b	N0	M0
Stadium II	T1	N2	M0
	T2a/b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T2a/b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
Stadium IIIB	T3	N2	M0
Stadium IV	T1, T2, T3	N3	M0
	T4	N1, N2, N3	M0
	jedes T	jedes N	M1

Tab.1.1.3.c: TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms (nach UICC, 7. Auflage 2010)

T – Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Keine Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der Lamina propria, hochgradige Dysplasie
T1a	Tumor infiltriert Lamina propria und Muscularis mucosae
T1b	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert Subserosa, Ligamentum gastrocolicum oder gastrohepaticum ohne Perforation des viszerale Peritoneums
T4a	Tumor perforiert Serosa (viszerale Peritoneum)
T4b	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen (Milz, Colon transversum, Leber, Zwerchfell, Pankreas, Bauchwand, Nebennieren, Niere, Dünndarm, Retroperitoneum, Duodenum, Ösophagus)

N – Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-2 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 3-6 regionären Lymphknoten
N3a	Metastasen in 7-15 regionären Lymphknoten
N3b	Metastasen in 16 oder mehr regionären Lymphknoten

M – Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab.1.1.3.d: UICC Stadiengruppierung basierend auf der TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms (nach UICC, 7. Auflage 2010)

Stadium	T – Primärtumor	N – Regionäre Lymphknoten	M – Fernmetastasen
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T2	N0	M0
	T1	N1	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
	T1	N2	M0
Stadium IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N2	M0
	T1	N3	M0
Stadium IIIA	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
Stadium IIIB	T4b	N0, N1	M0
	T4a	N2	M0
	T3	N3	M0
Stadium IIIC	T4a	N3	M0
	T4b	N2, N3	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

1.2. Kolorektales Karzinom

1.2.1. Definition und Epidemiologie

Beim kolorektalen Karzinom handelt es sich um einen malignen epithelialen Tumor des Kolons bzw. Rektums (Hamilton und Aaltonen 2000).

Mit einer Inzidenz von über 1 Million gezählten Fällen im Jahr 2002 steht es unter globalen Gesichtspunkten bei Männern auf Platz drei und bei Frauen auf Platz zwei aller Krebserkrankungen (Parkin et al. 2005, Boyle und Levin 2008). Das Erkrankungsverhältnis beider Geschlechter ist mit 1,2 zu 1 für Männer leicht erhöht.

Wie schon beim Magenkarzinom zeigen sich auch beim kolorektalen Karzinom große geografische Unterschiede. Während Neuseeland, Australien, Nordamerika, Europa und Japan zu den Hoch-Risiko-Gebieten zählen, werden geringere Inzidenzen in Asien und Afrika beobachtet (Boyle und Levin 2008).

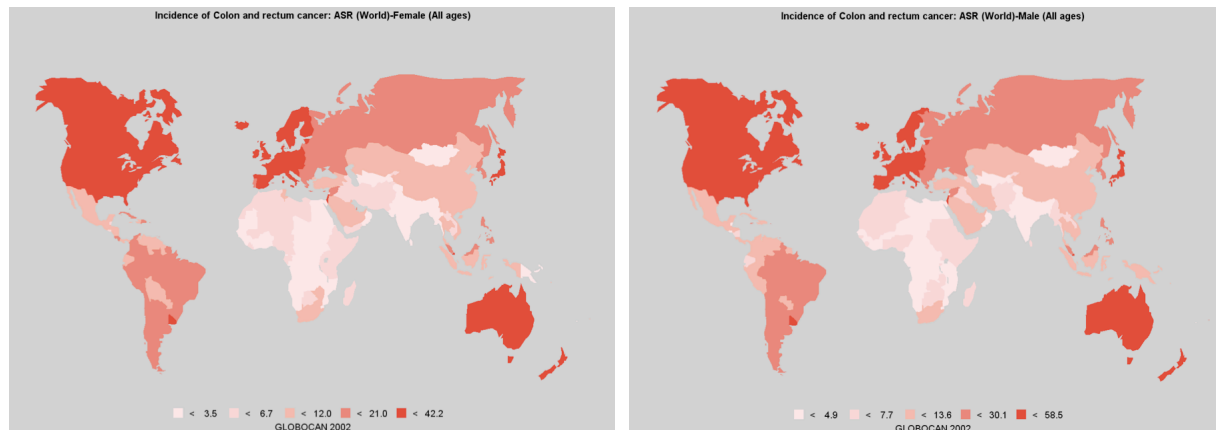


Abb.1.2.1.: Inzidenz des kolorektalen Karzinoms weltweit: Frauen (links), und Männer (rechts), Globoscan 2002 (Boyle und Levin 2008)

In Deutschland liegt die Neuerkrankungsrate gemäß Schätzungen des Robert Koch-Institutes für Männer bei über 37.000 Fällen und bei Frauen bei etwa 36.000 Fällen jährlich und entwickelt sich zur zweithäufigsten Krebsart in Deutschland. Männer erkranken im Mittel mit 69 Jahren, Frauen mit 75 Jahren (Robert Koch-Institut 2008). Seit den 80er Jahren, wobei bis dahin ein Anstieg der Inzidenzraten beider Geschlechter zu verzeichnen war, verlaufen die Trends auf Grund von veränderten Umwelt- und Lebensstilfaktoren unterschiedlich. Bei Männern setzt sich die Zunahme der Neuerkrankungsrate bis heute fort, bei Frauen dagegen ist seither ein Seitwärtstrend zu beobachten (Becker 2003).

Bei einer Gesamtmortalität von annähernd 50% der Inzidenzrate ist die 5-JÜR für Nordamerika mit 65%, für Westeuropa mit 54%, für Osteuropa mit 34% und für Indien mit 30% belegt (2002- 529.000 Todesfälle für beide Geschlechter) (Boyle und Levin 2008). Durch die Einführung von Screeningmethoden und Vorsorgeuntersuchungen wird seit Anfang der 80er Jahre ein kontinuierlicher und zunehmender Rückgang der Mortalitätsrate beobachtet (Becker 2003). Dennoch stellt das kolorektale Karzinom weltweit und auch in Deutschland die dritthäufigste krebbsbedingte Todesursache dar.

1.2.2. Pathogenese und Risikofaktoren

80-85% der kolorektalen Tumoren entstehen sporadisch. 10% sind hereditären Ursprungs und 5% entwickeln sich auf dem Boden von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Boese-Landgraf 1998). Für die Genese der kolorektalen Karzinome sind sowohl Umwelt- als auch genetische Faktoren verantwortlich. In der Literatur sind Risikofaktoren aus den Bereichen Ernährung, Lebensgewohnheiten, vorbestehenden Grunderkrankungen und iatrogenen Ursachen beschrieben, welche mittels verschiedener Studiendesigns diskutiert werden.

Anhand bisher gewonnener molekulargenetischer Untersuchungsergebnisse bei der familiären adenomatösen Polypose (FAP) hat Vogelstein ein genetisches Modell der Kolorektalkarzinogenese entwickelt (Boese-Landgraf 1998).

Grundlage der Adenom-Karzinom-Sequenz ist die aufeinanderfolgende Akkumulation genomischer Alterationen durch gekoppelte Aktivierung bzw. Inaktivierung von wenigsten vier bis fünf Onko- bzw. Tumorsuppressorgenen, die zunächst zu Hyperproliferation des Epithels, dann zu adenomatöser Entartung, dysplastischen Läsionen und schließlich zum Karzinom führen (Fearon und Vogelstein 1990). Dabei werden zwei Grundmechanismen der Kolorektalkarzinogenese unterschieden:

Chromosomeninstabilität (CMI): Diese wird bei hereditären und sporadischen (85%) Kolonkarzinomen beobachtet. Sie ist durch den Verlust von Allelen gekennzeichnet und beschreibt die Akkumulation von Mutationen in Tumorsuppressorgenen (APC, p53) und Onkogenen (K-ras), welche eine unregulierte intrazelluläre Anhäufung von Onkogenen, wie z.B. β -Catenin zur Folge haben (Takayama et al. 2006).

Mikrosatelliteninstabilität (MSI): MSI liegt dem HNPCC zugrunde, betrifft aber auch ca. 15% der sporadischen Kolontumoren. Sie beruht auf Mutationen in DNA-Mismatch-Repair Genen (hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6), welche üblicherweise Basenfehlpaarungen bei der Replikation beheben (Takayama et al. 2006, Trautman et al. 2006).

Hereditäre kolorektale Karzinomsyndrome

Die genetische Prädisposition mit familiärer Häufung entdeckt man bei ca. 10% der kolorektalen Karzinome. Mit einem Anteil von 2-5% ist das Lynch Syndrom (HNPCC) das häufigste hereditäre Tumorsyndrom (Hampel et al. 2008). Es unterliegt einem autosomal-dominanten Vererbungsschema, wobei 40-60% der Familien Keimbahn-mutationen in einem DNA-Mismatch-Repair Gen (meist MSH2 oder MLH1) aufweisen, die zu Replikationsfehlern und Mikrosatelliteninstabilitäten führen. Die ersten kolorektalen Karzinome und auch andere assoziierte Tumoren (Tumoren des Uterus, Leber, Nieren, Magen, etc.) treten bereits vor dem 50. Lebensjahr auf. Zur besseren Differenzierung und Abgrenzung gegenüber den sporadischen Karzinomen entwickelte man die Amsterdam- und Bethesda-Kriterien, die neben der Familienanamnese das Patientenalter und die Tumorhistologie mit einbeziehen (De la Chapelle 2002, Lynch et al. 2005).

An zweiter Stelle, mit einer Häufigkeit von weniger als 1% steht die familiäre adenomatöse Polypose. Als obligate Präkanzerose unterliegt dieses Krankheitsbild einem autosomal-dominanten Vererbungsschema, bei dem es zu einem massenhaften Polypenbefall des Kolons kommt. Charakteristisch ist die frühe Manifestation zahlreicher Adenome und bei unbehandeltem Verlauf können ab dem 40. Lebensjahr kolorektale Karzinome auftreten (Lynch et al 2003).

Des Weiteren kommt es im Rahmen des Gardner-Syndroms, Peutz-Jeghers-Syndroms und der familiären juvenilen Polypose vermehrt zu Kolonkarzinomen.

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen

Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED) sind ein signifikanter Risikofaktor für die Genese kolorektaler Karzinome. Auch wenn sie nur für 1-2% dieser verantwortlich sind, liegt ihre Mortalitätsrate deutlich höher als die der sporadischen Kolontumoren (Herszenyi et al. 2007). Etablierte allgemeine Risikofaktoren der CED sind das Diagnosealter, Ausmaß, die

Dauer und Schwere der Entzündung, die positive Familienanamnese für Kolontumoren und die Koexistenz einer primär sklerosierenden Cholangitis (Zisman und Rubin 2008).

Bei der Colitis ulcerosa steigt das Karzinomrisiko ca. 8-10 Jahre nach Erstdiagnose deutlich an. Nach 20 Jahren liegt das Risiko bei 5-10%, nach 30 Jahren bei 12-20% und nach 35 Jahren bei 30% (Gyde et al. 1988, Ekbom et al. 1990). Interessanterweise zeigen Winther et al. (2004) in einer dänischen Studie, dass im Vergleich zur Normalbevölkerung das Risiko für kolorektale Karzinome nicht signifikant erhöht sei. Die schnellere chirurgische Intervention bei medikamentös therapierefraktären Patienten wird hierbei diskutiert (Winther et al. 2004). Des Weiteren scheint das Karzinomrisiko bei singulärem Rektumbefall nicht gesteigert; die Proctitis ulcerosa höchstens ein moderater Risikofaktor für kolorektale Karzinome zu sein. Söderlund et al. benennen ein um 1,7 fach größeres relatives Risiko. (Ekbom et al. 1990, Söderlund et al. 2009, Peyrin-Biroulet et al. 2009)

Durch die heterogene Natur der Erkrankung mit teils fehlender Entzündungsbeteiligung des Kolons wurde dem Morbus Crohn anfänglich kein erhöhtes Karzinomrisiko zugeschrieben (Zisman und Rubin 2008). Langzeitstudien chronisch erkrankter Patienten zeigen inzwischen aber eine in etwa vergleichbare Karzinomrate wie bei der Colitis ulcerosa (Ekbom et al 1990, Friedman et al. 2001). In einer schwedischen Studie wird bei isoliertem Kolon-Befall durch Morbus Crohn ein relatives Risiko von 5,6 fach erhöht angegeben (Ekbom et al. 1990). Gyde et al. ermitteln ein relatives Risiko von bis zu 23,8, wogegen das Risiko der Allgemeinbevölkerung bei 4,3 läge (Gyde et al. 1980).

Molekulargenetische Veränderungen der CED weichen vom Schema der Adenom-Karzinom-Sequenz ab. Sie können sowohl aus flachen als auch aus großen dysplastischen Läsionen und Raumforderungen entstehen. Der Verlust des APC-Gens tritt in dieser Folge erst später auf und wird durch die frühe Dysfunktion und Verlust des Tumorsuppressorgens p53 abgelöst (Herzszenyi et al. 2007).

Begleiterkrankungen

Das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, steigt bei einem vorbestehenden Dünndarm-, Endometrium-, Mamma- oder Ovarialkarzinom. Eine erhöhte Inzidenz zeigen auch Patienten nach einer Magenoperation, Utero- und Sigmoidostomie oder nach einer hohen fäkalen Gallensäureproduktion bei vorbestehender Cholezystektomie oder Cholezystolithiasis (Lin 2009).

Risikofaktoren

Bei kolorektalen Karzinomen wird die Hypothese vertreten, dass Gemüse, Früchte und Getreide durch ihre Ballaststoffe, Vitamine und Spurenelemente, insbesondere Antioxidantien, Folsäure und Phytochemika protektive Eigenschaften erzeugen. Allerdings sind die Assoziationen experimentell teilweise schwach belegt.

Eine verminderte Zufuhr an frischem Obst und Gemüse wurde von einigen Autoren mit einem 0,5 fach höheren Risiko für die Entwicklung kolorektaler Karzinome benannt (Slattery et al. 1998, Terry et al. 2001).

In Abhängigkeit von der täglichen Ballaststoffzufuhr zeigt die EPIC-Studie eine signifikante Risikoreduktion für kolorektale Karzinome um das 0,75 fache. Dieser Effekt ist für linksseitig gelegene kolorektale Karzinome am größten, am geringsten für das Rektumkarzinom und ergibt eine Risikoreduktion von bis zu 40% bei konsequenter, langfristiger Verdoppelung der Ballaststoffzufuhr von 20g/Tag (Bingham et al 2003).

Darüber hinaus finden phytochemische Agentien einen gezielten therapeutischen Einsatz im Rahmen der Krankheits-Prävention. Isotretinoin, ein Mitglied der Retinoid-Familie, besitzt in seiner chemischen Struktur bzw. biologischen Aktivität Verwandtschaft zum Vitamin A (Retinol). Therapeutisch wird es, trotz bekannter Nebenwirkungen (allergischer Reaktionen, Hörstörungen, trockener Augen, Hornhauttrübungen, Transaminasenanstieg etc.) erfolgreich bei Krankheitsbildern wie schwerer Akne, Psoriasis und auch Hauttumoren eingesetzt

(Belsford und Beute 2008). Für Vitamin D konnten ebenfalls karzinopräventive Erfolge nachgewiesen werden. Über weitergeleitete intrazelluläre Prozesse nimmt Calcitriol modulierenden Einfluss auf Zellwachstum, Differenzierung und Apoptose (Hausler et al. 2008).

Des Weiteren wird ein erhöhter Konsum an rotem Fleisch (Rind, Schwein, Lamm) und Fett mit einer Risikosteigerung von 0% bis 25% diskutiert. Als ursächlich werden durchs Frittieren und Braten entstehende Karzinogene (polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, heterozyklische Amine und Nitrosamine) in Betracht gezogen (Norat et al. 2005, Larsson und Wolk 2006).

Regelmäßiger Alkoholkonsum wird bei mehr als 45mg/Tag als milder Risikofaktor eingestuft. Genau definierte Karzinogenesemechanismen sind in diesem Zusammenhang bisher nicht geklärt, jedoch werden genotoxische Effekte des Stoffwechselproduktes Acetaldehyd vermutet (Larsson et al. 2005). Auch hier potenziert sich das Risiko entsprechend dem Konsum- und Dosisumfang in Kombination mit Nikotinkonsum.

Körperliche Aktivität scheint das Risiko für Kolontumoren zu senken. Dagegen wird kein Effekt gegenüber dem Rektumkarzinom beschrieben (Friedenreich et al. 2006).

1.2.3. Einteilung

Kolorektale Karzinome werden anhand verschiedener Kriterien klassifiziert. Entsprechend dem makroskopischen Erscheinungsbild unterscheidet man drei Wachstumsmuster: den polypös-exophytischen, den schüsselförmig-exulzerierenden und den diffus-infiltrierenden Typ.

Klinisch-pathologisch fand initial die Dukes-Klassifikation der 30er Jahre ihre Anwendung. Sie unterteilte das kolorektale Karzinom nach der Wandinfiltrationstiefe des Tumors und der regionären Lymphknotenmetastasierung in vier Stadien (A-D), welche später durch die TNM-

Klassifikation der UICC ersetzt wurden (Hamilton und Aaltonen 2000). Die TNM-Einteilung wird in regelmäßigen Abständen von der UICC überarbeitet, um klinische und pathologische Erkenntnisse zusammenzuführen. In der vorliegenden Arbeit werden die Staging-Protokolle der UICC von 2002 (6. Auflage) berücksichtigt. Vergleichend sind die Veränderungen der 7. Auflage der UICC-Klassifikation von 2010 aufgelistet (Tab.1.2.3.a und b)

Neben der Unterscheidung des kolorektalen Karzinoms nach makroskopischem Wachstumsverhalten und Invasionstiefe wird für die Einteilung nach dem histologischen Erscheinungsbild die Klassifikation der WHO (1989) genutzt. Sie unterscheidet: Adenokarzinome, muzinöse Adenokarzinome, Siegelringzellkarzinome sowie weitere, seltene Varianten wie plattenepitheliale, adenosquamöse, undifferenzierte, klar- oder kleinzellige Karzinome (Hamilton und Aaltonen 2000).

Tab.1.2.3.a: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (nach UICC, 6. Auflage 2002)

T – Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria
T1	Tumor infiltriert die Submukosa
T2	Tumor infiltriert die Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum

N – Regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-3 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten

M – Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab.1.2.3.b: UICC Stadiengruppierung basierend auf der TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (nach UICC, 6. Auflage 2002)

Stadium	T – Primärtumor	N – Regionäre Lymphknoten	M – Fernmetastasen
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4	N0	M0
Stadium IIIA	T1, T2	N1	M0
Stadium IIIB	T3, T4	N1	M0
Stadium IIIC	jedes T	N2	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

Tab.1.2.3.c: TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (nach UICC, 7. Auflage 2010)

T – Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelial oder Infiltration der Lamina propria
T1	Tumor infiltriert Submukosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria
T3	Tumor infiltriert durch die Muscularis propria in die Subserosa oder in nicht peritonealisiertes perikolisches oder perirektales Gewebe
T4a	Tumor perforiert viszerale Peritoneum
T4b	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen

N – regionäre Lymphknoten	
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1a	Metastase in 1 regionärem Lymphknoten
N1b	Metastasen in 2-3 regionären Lymphknoten
N1c	Tumorknötchen bzw. Satellit(en) im Fettgewebe der Subserosa oder im nicht-peritonealisierten perikoloischen perirektalen Fettgewebe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen
N2a	Metastasen in 4-6 regionären Lymphknoten
N2b	Metastasen in 7 oder mehr regionären Lymphknoten

M – Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1a	Metastase(n) auf ein Organ beschränkt (Leber, Lunge, Ovar, nichtregionäre Lymphknoten)
M1b	Metastasen in mehr als einem Organ oder im Peritoneum

Tab.1.2.3.d: UICC Stadiengruppierung basierend auf der TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (nach UICC, 7. Auflage 2010)

Stadium	T – Primärtumor	N – Regionäre Lymphknoten	M – Fernmetastasen
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4a	N0	M0
Stadium IIC	T4b	N0	M0
Stadium III	jedes T	N1, N2	M0
Stadium IIIA	T1, T2	N1a	M0
	T1	N2a	M0
Stadium IIIB	T3, T4a	N1	M0
	T2, T3	N2a	M0
	T1, T2	N2b	M0
Stadium IIIC	T4a	N2a	M0
	T3, T4b	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stadium IVA	jedes T	jedes N	M1a
Stadium IVB	jedes T	jedes N	M1b

1.3. Somatostatin und Somatostatin-Rezeptoren

Somatostatin ist ein zyklisches Peptidhormon, welches aus 14 (sst-14) oder 28 Aminosäuren (sst-28) besteht. Als natürlicher Ligand der Somatostatin-Rezeptoren hemmt es zerebral die Freisetzung von Somatotropin, Thyreoliberin, Corticoliberin, Dopamin und Noradrenalin. Im Pankreas hemmt es Insulin und Glukagon, im lymphatischen Gewebe die Synthese von Immunglobulinen und die Lymphozytenproliferation, im Magen-Darm-Trakt hemmt es die Gastrin- und Magensäuresekretion, mindert die motorische Aktivität der Darmsegmente und die intestinale Absorption (Reubi 1992, Epelbaum et al. 1994).

Beim Menschen und bei anderen Säugetieren sind fünf Somatostatin-Rezeptoren bekannt. Ihre Nummerierung ergibt sich aus der Reihenfolge ihrer Entdeckung (Bell und Reisine 1993). Eine parallel existierende ältere Klassifikation bezieht sich auf die Bindungsaffinität gegenüber synthetischen, stabilen Somatostatin-Analoga. Sie zeichnen sich dadurch aus, eine deutlich längere Halbwertszeit als Somatostatin zu besitzen. Diese Klassifikation

unterscheidet SRIF₁ von SRIF₂ (Somatotropin release inhibiting factors). Die Rezeptorgruppe der SRIF₁ besitzt eine höhere Affinität gegenüber den Analoga (Octreotid, Lanreotid, Seglitid und Vapreotid) und kennzeichnet die später benannten SSTR 2, 3 und SSTR 5. Die Gruppe der SRIF₂ dagegen weist eine geringere Bindungsaffinität gegenüber den Somatostatin-Analoga auf und charakterisiert die Unterformen SSTR 1 und 4 (Yamada et al. 1992c, Corness et al. 1993, Rohrer et al. 1993, Baumeister et al 1998). Interessanterweise besitzen alle Rezeptoren dieselbe hohe Bindungsaffinität für die zwei aktiven Formen des Somatostatins (sst-14 und -28) sowie Cortistatin, einem endogenen neuroendokrinen Polypeptid (CSF-17) mit hoher struktureller Verwandtschaft zu Somatostatin. Die Ausnahme bildet SSTR 5, welcher eine 10-fach höhere Bindungseigenschaft für SRIF-14 hat (Hoyer et al. 2008).

Die humanen Somatostatin-Rezeptoren gehören zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) der Klasse I. Diese sind durch sieben Transmembrandomänen charakterisiert. Aus diesen hydrophoben, α -helicalen Transmembrandomänen formieren sich extra- und intrazellulär gelegene Schleifen (β -Blätter), an denen zum einen die Ligandenbindung und -erkennung, zum anderen die Kopplung der G-Proteine erfolgt, über die weitere Kaskadeschritte eingeleitet werden.

Die Somatostatin-Rezeptoren werden von fünf einzelnen Genen kodiert, die auf fünf separaten Chromosomen lokalisiert sind und beim Menschen in ihrer kodierenden Region intronlos sind. Sie beinhalten 364 bis 418 Aminosäuren und sind untereinander zu 39% bis 57% homolog (Yamada et al. 1992c, Patel 1999). Überdies wurde bei allen menschlichen und speziesfremden SSTR-Subtypen ein hoch konserviertes Sequenzmotiv YANSCANPI/VLY in der siebten Transmembrandomäne gefunden, das ein typisches Merkmal dieser Rezeptorfamilie darstellt (Olias et al. 2004).

Signaltransduktion

Somatostatin-Rezeptoren vermitteln ihre zelluläre Antwort über eine G_i -Protein-gekoppelte Modulation verschiedener Second-Messenger-Systeme. Ihre Wirkungen sind abhängig von Pertussistoxin-sensitiven GPT-Bindungsproteinen (kurz: G-Protein), welche die Inhibition von Adenylatcyclasen, spannungsabhängigen Kalziumkanälen und die Mobilisation intrazellulär gelegenen Kalziums sowie die Stimulation spannungsabhängiger Kaliumkanäle und Proteinphosphatasen erzielen. Zusätzlich findet man als Besonderheit der SSTR in Kolonkarzinomen eine Kopplung an Na^+/H^+ -Ionenaustauschern über Pertussistoxin-insensitive Mechanismen, so dass Aktivierungen über verschiedene GPCR vermutet werden können (Hou et al. 1994). Funktionelle Studien lassen darauf schließen, dass endogene, an $G_{i,1}$ gekoppelte Rezeptoren die Adenylatcyclase inhibieren, an $G_{o,2}$ gekoppelte Rezeptoren Kalziumkanäle inhibieren und an $G_{i,3}$ gekoppelte Rezeptoren Kaliumkanäle stimulieren (Patel et al. 1999). Die vermutlich dahinter stehenden Funktionsspektren der einzelnen SSTR-Subtypen werden unter 1.3.1. bis 1.3.4. aufgeführt.

Vorkommen

In *in vivo* und *in vitro* angelegten Experimenten gelang der ubiquitäre Nachweis aller fünf Somatostatin-Rezeptoren beim Menschen und beim Tier (Lamberts et al. 1991). mRNA aller fünf Subtypen konnte im zerebralen Kortex, Kleinhirn, Großhirn, hypophysär, im Hypocampus, Hypo- und Thalamus, Amygdala, Striatum und im olfaktorischen Bulbus nachgewiesen werden. In peripheren Geweben fand man mRNA und/oder Proteine der SSTR in den Pankreasinseln, im Gastrointestinaltrakt, in der Lunge, Niere, Leber, Milz, im Skelettmuskel, im Herzen, in der Retina und in den Blutgefäßen, aber auch in tumorös verändertem Gewebe, tumorversorgenden Blutgefäßen und verschiedenen Blutbestandteilen (Srikant und Patel 1981, Breder et al. 1992, Yamada et al. 1992a, Bruno et al. 1993, Rohrer et al. 1993, O'Carroll et al. 1994, Gugger et al. 2004, Hoyer et al. 2008).

1.3.1. SSTR 1

Der Somatostatin-Rezeptor 1 gehört zu den Klasse A GPCRs, dessen Kodierung auf dem Chromosom 14q13 erfolgt. Sein Wirkmechanismus wurde anfänglich kontrovers diskutiert. Später bewies man, dass SSTR 1 eine Inhibition der Adenylatcyclase bzw. eine Inhibition der NHE1 (Na⁺/H⁺-Transporter Isoform 1) bewirkt. In Mäusen und Ratten wurde über diese Wirkmechanismen eine Modulation und Kontrolle der GH- und Somatostatin-Spiegel nachgewiesen; beim Menschen bestätigte sich darüber hinaus ein antiproliferativer Effekt in Endothelzellen im HUVA Modell am Beispiel der Umbilikalvene (Yamada et al. 1993, Kreienkamp et al. 1999, Adams et al. 2004, Mastridimou und Thermos 2004).

Die SSTR 1-mRNA konnte mittels Blot-Verfahren zu hohen Anteilen im Jejunum und Magen gefunden werden. Geringere Konzentrationen entdeckte man im Kolon, Kolonkarzinom und der Niere. Weiterhin konnte SSTR 1 im Mäuse- und Rattenhirn und beim Menschen in der Hypophyse, im frontalen Kortex, im Hippocampus und im Kleinhirn nachgewiesen werden (Yamada et al. 1992c, Yamada et al. 1993, Li et al. 1992, Hou et al. 1994, Schindler et al. 1995).

1.3.2. SSTR 2

Der Somatostatin-Rezeptor 2 wird beim Menschen auf Chromosom 17q24 kodiert. Im Gegensatz zu SSTR 1, 3, 4 und 5 fand man bei Untersuchungen am murinen SSTR 2-Gen ein Intron am 3'-Ende des kodierenden Bereiches. Durch Splicing gelang es zwei Isoformen zu klonieren (SSTR 2A und SSTR 2B), die sich in der Länge ihrer Aminosäuresequenzen unterscheiden. SSTR 2B ist mit einem Rückstand von 23 Aminosäuren die kürzere Variante (Vanetti et al. 1992, Yamada et al. 1993, Guillermet-Guibert et al. 2005).

Bisher ist SSTR 2 beim Menschen in der Hypophyse, im Pankreas und im Gastrointestinaltrakt gefunden worden. Bei Ratten und Mäusen konnte er im Gehirn

nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde der Subtyp SSTR 2A in enterochromaffin-ähnlichen Zellen und in Nervenfasern, SSTR 2B hingegen in der Magenschleimhaut gefunden (Schindler 1998a,b, Schulz et al. 1998, Allen 2003).

Im Gegensatz zu SSTR 1, der ausschließlich in Axonen nachgewiesen wurde und somit in präsynaptische Mechanismen involviert ist, kommen die Subtypen SSTR 2A und 2B vorwiegend im sensodendritischen Kompartiment vor, wodurch sie bei postsynaptischen Prozessen eine Rolle spielen (Schulz et al. 1998a,b).

Die antiproliferative Wirkung von SSTR 2 wird über PTP-abhängige MAPK-Modulation erreicht, die mit der Induktion des Retinoblastomsuppressor-Proteins (Rb-Protein) und der p21-Aktivierung einhergehen (Sakanaka et al. 1994, Chen et al. 1997).

1.3.3. SSTR 3

Der Somatostatin-Rezeptor 3 wird auf dem Chromosom 22 kodiert, besteht aus 418 Aminosäuren und besitzt eine molekulare Masse von 65-85 kDa. Wie bei den anderen humanen SSTR ist das Rezeptor-Gen in seiner kodierenden Region intronlos (Yamada et al. 1992b, Corness et al. 1993, Helboe et al. 1997).

Anfänglich wurde für SSTR 3 eine geringe Affinität gegenüber Octreotid beschrieben (Yasuda et al. 1992). Hoyer et al. ordnen ihn jedoch auf Grund seiner strukturellen Besonderheiten und hohen Affinität zu den Somatostatin-Analoga zu den SRIF₁. In seiner Genomsequenz sind bis zu 90%ige Homologien zu SSTR 2 und 5 und 80%ige Homologien gegenüber SSTR 1 und 4 zu finden (Hoyer et al. 1995). Bezüglich seiner Affinität bevorzugt er den Liganden sst-14 mit einem fast 4-fach höheren Bindungsvermögen im Vergleich zu sst-28 (Corness et al. 1993).

Wie auch bei den anderen vier SSTR erfolgt in der Signaltransduktionskaskade eine Hemmung der Adenylatcyclase über ein heterotrimers, Pertussistoxin-sensitives G_i-Protein

(Patel et al. 1994). Ist dieser erste Schritt erfolgt, kommt es zu einer Abnahme der intrazellulären cAMP Konzentration, die mehrere Schritte nach sich zieht. Durch Aktivierung von Phosphotyrosin-Phosphatasen (PTP) folgt eine Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 und des pro-apoptotischen Bax-Proteins, die eine Apoptoseinduktion nach sich ziehen (Sharma und Sirkant 1998). Zum anderen erfolgt eine PTP-abhängige MAPK-Modulation mit erhöhter Expression von p27^{Kip1}, worüber ein Zellzyklusarrest eingeleitet wird und somit mit einer Antiproliferation einhergeht (Lahlou et al. 2004). Eine andere Studie konnte beweisen, dass in humanen mitogen-aktivierten Jurkat-Zellen (T-Lymphozyten) durch Somatostatin via SSTR 3 ein Rückgang der IL-2 Sekretion erreicht wird, welcher eine verminderte T-Zellproliferation zur Folge hat (Cardoso et al. 1998).

SSTR 3-mRNA konnte im humanen Großhirn, Kleinhirn, frontalen Cortex, Hippocampus, in T-Zellen (Jurkat), Abdomen (Leber und Milz) und in β -Zellen des Pankreas gefunden werden (Yamada et al. 1992, Schindler et al. 1995, Kumar et al. 1999, Patel 1999).

1.3.4. SSTR 4

Die Kodierung des Somatostatin-Rezeptor 4 erfolgt auf dem Chromosom 20q11.2 (Xu et al 1993, Rohrer et al. 1993). Er ist hochaffin gegenüber sst-14 und -28, zeigt aber interessanterweise nur ein spärliches Bindungsverhalten gegenüber den Somatostatin-Analoga, was seine Funktion als diagnostisches und therapeutisches Zielobjekt begrenzt (Rohrer et al. 1993).

Signaltransduktionsmechanismen werden über die G_i/G_o-Protein-gekoppelte-Rezeptorfamilie und anschließend über eine Inhibition der Adenylatcyclase erzielt. Weitere sekundäre Mechanismen laufen über noch unbekannte G-Proteine mit dem Effekt der Kaliumkanalaktivierung und Kalziumkanalinhibition sowie über Aktivierung von Protein Tyrosin-Phosphatasen, Na⁺/H⁺-Austauschern, MAPK Kaskaden und Phospholipase A₂ (Kaupmann et al. 1993, Siehler und Hoyer 1999, Patel 1999). Stapanyan et al. wiesen SSTR

4 in hypothalamischen Neuronen des Rattenhirnes nach, so dass die Möglichkeit besteht, dass SSTR 4 funktionell neben SSTR 1 und 2 als Effektor im Wachstumshormon-Kreislauf agiert (Stepanyan et al. 2003).

Beim Menschen zeigt sich ein ubiquitäres Vorkommen in Blutgefäßen, im Hippocampus, Lungengewebe, in der Plazenta und zytotrophoblastischen Zellen sowie eine spärliche Expression in den β -Zellen des Pankreas. Bei Nagetieren konnte SSTR 4 im Hippocampus, in der Amygdala, olfaktorischen Bulbus, Kortex, Hypothalamus sowie in der Milz, im Herz, in der Aorta, Niere und in Magenepithelien des Fundus gefunden werden (Caron et al. 1997, Kumar et al. 1999, Patel 1999).

1.3.5. SSTR 5

Die Kodierung des Somatostatin-Rezeptor 5 erfolgt auf dem Chromosom 16q13.2. Mit 364 Aminosäuren erreicht er eine molekulare Masse von 52-55 kDa (Yamada et al. 1993, Panetta et al. 1994, Helboe et al. 1997) und ist mit einer 12,6 fach größeren Bindungsaffinität für sst-28 gegenüber sst-14 gekennzeichnet (Panetta et al. 1994).

Die mRNA des hSSTR5 wurde im Dünndarm, Herz, in den Nebennieren, im Kleinhirn, in der Hypophyse, Plazenta, im Skelettmuskel, nicht jedoch in Niere, Leber, Uterus, Thymusdrüse, Hoden, Milz, Lunge, Schilddrüse, Ovar, Mamma oder zerebralem Kortex gefunden (O'Carroll et al. 1994, Panetta et al. 1994). Daneben werden alle Somatostatin-Rezeptoren in den β -Zellen des Pankreas exprimiert. SSTR 5 nimmt dabei eine Schlüsselrolle im pankreatischen Hormonkreis ein. Zusammen mit hSSTR 1 reguliert er über die Insulinausschüttung den Glukose Metabolismus (Patel 1999, Patel et al. 2009). Bei Ratten wird die Wachstumshormonsekretion hypophysärer somatotropher Zellen vornehmlich zusammen mit SSTR 2 unterbunden (Kumar et al. 1997).

1.3.6. SSTR und maligne Erkrankungen

Mittels molekularbiologischer Techniken ließ sich das mRNA-Expressionsmuster aller fünf Somatostatin-Rezeptoren bei verschiedenen Spezies weitgehend beschreiben. Beim Menschen sind die Somatostatin-Rezeptoren im gesunden Organismus organ- bzw. gewebespezifisch verteilt. In Tumorzellen gibt es allerdings heterogene Expressionsmuster. SSTR 2 ist in 90% aller Karzinoide vorhanden. Der SSTR 5 findet sich bei 80% der endokrinen pankreatischen Tumoren (de Herder und Lamberts 2002). Überdies wurden sie in einer großen Anzahl anderer Tumoren nachgewiesen. Dazu gehören Hirntumoren (Wachstumshormon-produzierende und hormoninaktive Hypophysentumoren, Meningeome, Astrozytome, Neuro- und Medulloblastome), Akustikusneurinome und Phäochromozytome sowie das medulläre Schilddrüsenkarzinom, kleinzellige Bronchialkarzinome, Lymphome und Leiomyome und Karzinome des Magens, der Leber, Nieren, Prostata, Mamma und Ovarien (Reubi 2003, Stafford et al. 2004). Deren Vorkommen beschränkt sich somit keinesfalls auf neuroendokrine Tumoren.

In Anbetracht der vielfältigen physiologischen Funktionen der natürlichen Liganden (sst-14- und 18) und des Effektes der Somatostatin-Analoga ist das Expressionsmuster der Somatostatin-Rezeptoren im Magen- und Kolonkarzinom neben diagnostischer und prognostischer Informationen insbesondere in Hinblick auf mögliche therapeutische Ansätze interessant. So konnte *in vivo* und *in vitro* eine Hemmung des malignen und auch benignen Zellwachstums bewiesen werden (Weckbecker et al. 1998). Am Beispiel von Octreotid gelang via Aktivierung der SSTR eine Stabilisation des Wachstumsprozesses neuroendokriner Tumoren durch Inhibition von IGF-1 und der Angiogenese (Arnold et al. 1996).

1.4. Aufgabenstellung

Die diagnostische und therapeutische Relevanz der Somatostatin-Rezeptoren ist bei der Behandlung neuroendokriner Tumoren seit langem bekannt und etabliert. Da aber die Expression von SSTR generell nicht auf neuroendokrine Tumoren begrenzt ist, besteht die Möglichkeit, dass Somatostatin-Rezeptoren für die Behandlung anderer, nicht-neuroendokriner Tumoren ein potentielles, diagnostisches und therapeutisches „Target“ ist. In dieser Studie sollte die Hypothese geprüft werden, ob Magen- und Kolonkarzinome Somatostatin-Rezeptoren exprimieren, ob deren Expression eine potentielle tumorbiologische Relevanz hat und damit grundsätzlich zur Behandlung dieser Tumorentitäten in Betracht kommen. Bisherige Arbeiten zum Magen- und Dickdarmkrebs zeigen widersprüchliche Resultate hinsichtlich des Expressionsverhaltens der Somatostatin-Rezeptoren (Laws et al. 1997, Kostenich et al. 2005).

Die Expression der Somatostatin-Rezeptoren 1, 3, 4 und 5 wurde immunologisch im Magen- und Kolongewebe untersucht und miteinander verglichen. Dafür wurde im ersten Schritt anhand von Tissue Microarrays die Expression der Rezeptor-Subtypen in Magen- und Kolonkarzinomen untersucht und mit den korrespondierenden Normalgeweben derselben Patienten verglichen. Im zweiten Schritt wurden die Expressionsmuster mit verschiedenen Patienten- und Tumorcharakteristika (Patientengeschlecht, Laurén-Klassifikation, Primärtumorstadium, Lymphknotenmetastasierungsstatus, histopathologischer Differenzierungsgrad, UICC-Stadium) korreliert.

2. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

Die Präparate der Magen- und Kolongewebeproben stammen aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg. Sie wurden während der Jahre

1995 bis 2005 von der Klinik für Chirurgie des Universitätsklinikums im Rahmen von Operationen gewonnen.

2.1.1. Charakterisierung des Patientenkollektivs – Magen

Die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten an Magenproben von insgesamt 181 Patienten, deren Eigenschaften einzeln in Tabelle 2.1.a aufgeschlüsselt sind.

Zum Zeitpunkt der Operation lag das Alter der Patienten zwischen dem 25. und 87. Lebensjahr, einem Mittel von $65,3 \pm 12,0$ Jahren. Die Geschlechterverteilung wies eine Verteilung von 112 (61,9%) Männern zu 69 (38,1%) Frauen auf.

Tab.2.1.a: Magen – Patientenkollektiv für die immunhistologische Untersuchungen an den Tissue Microarrays

Patienten	[n(%)]	181
Alter	[Mittelwert $\pm$ Stabw.]	65,3 $\pm$ 12,0
Geschlecht	Männer [(n%)]	112 (61,9)
	Frauen [(n%)]	69 (38,1)
Tumortyp	diffus [(n%)]	63 (34,8)
	intestinal [(n%)]	118 (65,2)
T-Stadium	pT1 [(n%)]	19 (10,5)
	pT2a [(n%)]	21 (11,6)
	pT2b [(n%)]	56 (30,9)
	pT3 [(n%)]	74 (40,9)
	pT4 [(n%)]	11 (6,1)
N-Stadium	pN0 [(n%)]	50 (27,6)
	pN1 [(n%)]	67 (37,0)
	pN2 [(n%)]	38 (21,0)
	pN3 [(n%)]	24 (13,3)
	fehlend	2
M-Stadium	pM0 [(n%)]	1 (0,6)
	pM1 [(n%)]	28 (15,4)
	pMx	152
UICC-Tumorstadium	Stadium I [(n%)]	43 (23,8)
	Stadium II [(n%)]	45 (24,9)
	Stadium III [(n%)]	44 (24,3)
	Stadium IV [(n%)]	49 (27,1)
Differenzierungsgrad	G1 [(n%)]	4 (2,21)
	G2 [(n%)]	52 (28,7)
	G3 [(n%)]	115 (63,5)
	G4 [(n%)]	10 (5,5)

Tab.2.1.b: Magen – Patientenkollektiv für die immunhistologische Untersuchungen an den Tissue Microarrays

Tumortyp	Geschlecht		Alter (Jahren)
	männlich (%)	weiblich (%)	
<i>diffus</i>	31 (27,7)	32 (46,4)	67,1 ± 11,0
<i>intestinal</i>	81 (72,3)*	37 (53,6)	62,2 ± 13,4

* $p < 0,001$

Von den 181 in Paraffin eingebetteten Magenkarzinomen waren 118 vom intestinalen Typ und 63 vom diffusen Typ. 81 (72,3%) Männern konnte ein Magenkarzinom vom intestinalen Typ und 31 (37,3%) Männern ein Magenkarzinom vom diffusen Typ zugeordnet werden. Bei den Frauen verhielt sich diese Verteilung ausgewogener, 37 (53,6%) Patientinnen zeigten ein Magenkarzinom vom intestinalen Typ und 32 (46,4%) Patientinnen ein Magenkarzinom vom diffusen Typ.

Gemäß des pTNM-Schemas konnten 19 Fälle (10,5%) dem Stadium T1, 77 (42,5%) dem Stadium T2, 74 (40,9%) dem Stadium T3 und 11 (6,1%) dem Stadium T4 zugeordnet werden. Ein regionärer Lymphknotenbefall war bei 129 (71,3%) Patienten nachweisbar, bei 50 (27,6%) Patienten lag dieser nicht vor und konnte in 2 Fällen nicht beurteilt werden. 28 (15,4%) Patienten wiesen Fernmetastasen auf, 1 Patient (0,6%) hatte keine und bei 152 Fällen lagen keine Informationen vor. 4 (2,2%) von 182 Karzinomen waren gut differenziert (G1), 52 (28,3%) mäßig differenziert (G2), 115 (63,5%) gering differenziert (G3) und 10 (5,5%) undifferenziert (G4).

2.1.2. Charakterisierung des Patientenkollektivs – Kolon

In diesem Kollektiv waren 82 Patienten eingeschlossen, deren Eigenschaften in Tabelle 2.1.c aufgezeigt sind.

Zum Zeitpunkt der Operation waren die 82 Patienten 35 bis 91 Jahre alt (Mittel $65,6 \pm 12,1$ Jahre). Das Geschlechterverhältnis wies eine Verteilung von 49 (59,8%) männlichen zu 33 (40,2%) weiblichen Patienten auf.

Entsprechend des pTNM-Schemas der UICC von 2002 konnten 3 (3,7%) Fälle dem Stadium T1, 13 (15,9%) Fälle dem Stadium T2, 55 (67,1%) Fälle dem Stadium T3 und 10 (12,2%) Fälle dem Stadium T4 zugeordnet werden. In einem Fall war der Primärtumor nicht beurteilbar. Regionäre Lymphknotenmetastasen waren bei 36 (43,9%) Patienten zu finden, 43 (52,4%) Patienten zeigten keinen Befall und in 3 Fällen konnte der Nodalstatus nicht beurteilt werden. Fernmetastasen wiesen 11 (13,4%) Patienten auf; 39 (47,6%) waren frei von diesen. Bei 32 Patienten wurden diesbezüglich keine Angaben gemacht. Von den 82 Karzinomen waren 3 (3,7%) gut, 73 (89,0%) mittelgradig und 6 (7,3%) gering differenziert.

Tab.2.1.c: Kolon – Patientenkollektiv für die immunhistologische Untersuchung an den Tissue Microarrays

Patient	[(n%)]	82
Alter	[Mittelwert ± Stabw.]	65,6 ± 12,1
Geschlecht	Männer [(n%)]	49 (59,8)
	Frauen [(n%)]	33 (40,2)
T-Stadium	pT1 [(n%)]	3 (3,7)
	pT2 [(n%)]	13 (15,9)
	pT3 [(n%)]	55 (67,1)
	pT4 [(n%)]	10 (12,2)
	pTx	1
N-Stadium	pN0 [(n%)]	43 (52,4)
	pN1 [(n%)]	18 (22,0)
	pN2 [(n%)]	18 (22,0)
	pNx	3
M-Stadium	pM0 [(n%)]	39 (47,6)
	pM1 [(n%)]	11 (13,4)
	pMx	32
UICC-Tumorstadium	Stadium I [(n%)]	13 (15,9)
	Stadium II [(n%)]	32 (39,0)
	Stadium III [(n%)]	24 (29,3)
	Stadium IV [(n%)]	12 (14,6)
	fehlend	1
Differenzierungsgrad	G1 [(n%)]	3 (3,7)
	G2 [(n%)]	73 (89,0)
	G3 [(n%)]	6 (7,3)

2.2. Probenvorbereitung

2.2.1. Antikörper

Die für diese Arbeit verwendeten Kaninchen-Antikörper wurden freundlicherweise von Professor Dr. med. S. Schulz (Universität Jena) zur Verfügung gestellt. Die Grundlage bildeten hierbei kommerziell erhältliche Aminosäuresequenzen (anti-sst₁ [Produkt Nr. 4819], anti-sst₃ [4823], anti-sst₄ [6002], anti-sst₅ [6006]) der Firma Gramsch Laboratories, Schwabhausen, Deutschland.

2.2.2. Tissue Microarray

Alle hier untersuchten Gewebeproben sind in 10% gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Die histologische Begutachtung der Präparate erfolgte an HE-gefärbten Schnittpräparaten.

Für die Herstellung der Tissue Microarray wurden auf den Objektträgern tumorhaltige Areale und tumorfreie Schleimhaut markiert und auf die korrespondierenden Paraffinblöcke übertragen. Aus diesen Gewebelöcken wurden mittels des MTA Booster Tissue Arrays (Alpha Metrix Biotech GmbH, Rödermark, Deutschland), Gewebeproben als 0,6mm dicke Stenzen entnommen und in einen Empfängerparaffinblock gebracht. Eine Gruppe bestand jeweils aus 6 Proben des Adenokarzinoms und 6 Proben Normalgewebe des gleichen Organs eines Patienten.

Von diesem neuen Paraffinblock wurden am Rotationsmikrotom (Microtom HM 335E, MICROTOM GmbH, Walldorf, Deutschland) Serienschnitte mit einer Dicke von 3µm für die immunhistologischen Färbungen hergestellt und auf Superfrost-Ultra-Plus-Objektträger (Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. In den Tissue Microarrays waren nicht alle Zell- und Gewebearten gleich häufig vertreten.

2.3. Immunhistochemische Färbung

Zum Nachweis der einzelnen Somatostatin-Rezeptoren im Magen- und Kolongewebe wurde die Immunhistochemie verwendet. Immunfärbungen erfolgten für SSTR 1, 3, 4, 5 an den Magen- und für SSTR 1, 3, 4 an den Kolonproben.

Die Paraffinschnitte wurden im Brutschrank bei 60°C über Nacht getrocknet. Die Entparaffinisierung und Rehydrierung erfolgte 3 x 5min mit Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 75%). Um in der weiteren Verarbeitung der Schnitte ein Austrocknen der Präparate zu vermeiden, wurde die jeweilige Inkubation in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Die hitzeinduzierte Antigendemaskierung erfolgte für SSTR 1 in den Magen- und Kolonpräparaten mit 1mM EDTA-Puffer (29,2g EDTA-Substrat [Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Deutschland], 1l dH₂O, pH 8,0, 1:100 verdünnt) bzw. für SSTR 3, 4 und 5 mit 0,1M Na-Citratpuffer (Zusammenführung von 75ml Stammlösung A: 29,4g Trinatriumcitratthydrat [Firma Merck, Darmstadt, Deutschland], 1l dH₂O; 25ml Stammlösung B: 2,4g Citronensäure-Monohydrat [Firma Merck, Darmstadt, Deutschland], 200ml dH₂O; 900ml dH₂O) in der Mikrowelle für 3 x 10min bei 600W. Nach 10-minütigem Abkühlen der Präparate bei Raumtemperatur und anschließender Wässerung sowie Spülung in Tris-Puffer (9g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan [Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz], 68,5g Tris-HCL [Firma Merck, Darmstadt, Deutschland], 87,8g NaCl [Roth, Karlsruhe, Deutschland], 1l dH₂O, 1:10 verdünnt) wurde der Primärantikörper in RPMI-Puffer (5ml RPMI-Medium [Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland], 500mg fetales Kälberserum [Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland], 50ml dH₂O, 50µg Natriumazid, pH 7,4-7,6) verdünnt aufgetropft (100µl/Schnitt). Das Verdünnungsverhältnis Primär-AK/RPMI betrug 1:5 für (SSTR 1, 3 und 4) oder 1:20 (SSTR 5). Die Schnitte wurden in einer feuchten Kammer untergebracht und für 60min bei 37°C inkubiert. Die folgende Sekundärantikörperreaktion wurde mit Hilfe des Avidin-Biotin-Komplexes sichtbar gemacht. Nach mehrmaligen Tris-Puffer Spülungen wurde

der biotinmarkierte Sekundärantikörper (anti-rabbit IgG) in einer Verdünnung von 1:100 appliziert und bei Raumtemperatur für 30min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Spülen wurde das Präparat 30min bei Raumtemperatur in verdünnter alkalischer Phosphatase konjugierter Streptavidin-Lösung inkubiert. Danach wurde wiederholt mit Tris-Puffer gespült und Fast Red aufgetragen. Dafür wurde eine „Fast-Red“-Tablette in 4ml dH₂O in 4 Tropfen des mitgelieferten Tris-Spülpuffers gelöst, durch den vom Hersteller mitgelieferten Filter gemäß Angaben geklärt und auf das Präparat aufgetropft. Die Einwirkdauer betrug 15min in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde Hämalun nach Mayer genutzt, um die Schnitte zum Schluß mit Gelantine einzudecken. Als Positivkontrolle wurde Hypophysengewebe benutzt, als Negativkontrolle Magen- bzw.- Kolongewebe ohne Primärantikörper.

3. Auswertung

3.1. Lichtmikroskopische Auswertung

Bei der Auswertung der Präparate wurde am Lichtmikroskop Olympus Vanox AHB 3 (Olympus optical co., LTD. Japan) unter 20-, 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung die Expression der Somatostatin-Rezeptoren in Tumorzellen, -stroma, Drüsen, Foveolarepithel, Krypten und Bindegewebe beurteilt. Dabei wurden die immunhistochemischen Färbungen entsprechend ihrer Intensitätsstufen mit einem Punktesystem kategorisiert. Die Färbeintensität wurde für jede Stanze einzeln geschätzt und staffelte sich auf einer Skala von 0 bis 3 (0 = keine, 1 = schwach, 2 = mittlere/mäßig und 3 = stark positive Anfärbung). Um die Auswertung zu objektivieren, erfolgte an einigen Schnitten eine exemplarische Zweidurchsicht.

Tab.3.1.a: Beispiel für die tabellarische Auswertung – Magen

Fallnr.	Magen	Lokalisation	TU	Stroma	Interstitium	Drüsen	Fo	IM
Fall 1	NT	Co			0	2		
		Co			1	2		
		Co			0	2		
		IM			2	2		1
		Co			0	2	2	
		Co + Fo			0	2	3	
	TU	Tu	3	0				
		Tu	3	0				
		Tu	3	1				
		Tu	3	0				
		Tu	3	0				
		Tu	3	0				

Erklärung:

Tu = Tumor

Co = Corpus

IM = intestinale Metaplasie

NT = Nicht Tumor

Fo = Foveolen

Nach der mikroskopischen Auswertung wurden die Werte der Einzelstanzen eines Patienten addiert und durch die Zahl der Stanzen dividiert, um einen fallbezogenen mittleren Immunreaktivitätsscore zu erhalten. Bedingung hierfür war das Vorhandensein von mindestens ≥ 2 Stanzen pro Fall.

Bsp. für die Ermittlung der mittleren Färbeintensität: drei Stanzen mit Corpusdrüsen, erste Stanze- Drüse mit der Färbeintensität 1, zweite Stanze- Drüse mit der Färbeintensität 2, dritte Stanze- Drüse mit der Färbeintensität 3. Die Summe der Färbeintensitäten beträgt 6. Es wurde anschließend durch 3 dividiert und eine mittlere Färbeintensität von 2 errechnet.

3.2. Statistische Methoden

Die erfassten Daten wurden mit Hilfe von Microsoft Excel, Version 12.0 dargestellt, ihre Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 17.0, Version 17.0.0.

Hierbei wurden für die Magen- bzw. Kolonproben die Parameter Primärtumorstadium, Metastasierung in regionäre Lymphknoten, histopathologischer Differenzierungsgrad, UICC-Stadium und Geschlecht entsprechend ihrer Färbeintensität in Tumorzellen, tumorfreier Schleimhaut (Corpus, Antrum und Foveolarepithel) und in der metaplastischen Schleimhaut

zueinander in Beziehung gesetzt. Außerdem erfolgte eine Untersuchung des Tumorstromas für intestinale und diffuse Magenkarzinome. Auf Grund fehlender Angaben wurde auf eine Auswertung des Merkmals Fernmetastasierung (M-Stadium) verzichtet.

Einerseits wurden die Häufigkeiten der einzelnen Variablen bestimmt, andererseits wurden ausgewählte Variablen mit Hilfe einer univariaten Analyse auf signifikante Unterschiede untersucht. Dimensionale Werte wurden in Form von Mittelwerten und ihrer $\pm$ Standardabweichung angegeben. Wurde die Abhängigkeit metrischer und gruppierter Variablen untersucht, kam als Mittelwertvergleich entweder der zweiseitige t-Test für unabhängige bzw. gepaarte Stichproben oder die einfaktorielle Varianzanalyse (ONEWAY ANOVA) zur Anwendung. Bei Signifikanz wurde dann der POST HOC-Test verwendet, um mit Hilfe dieses Mehrfachvergleiches herauszufinden, zwischen welchen Gruppen es signifikante Unterschiede gab. Beim Vergleich von gruppierten Variablen (z.B. Geschlecht vs. T-Stadium, Geschlecht vs. Laurén-Klassifikation) wurden bei der Auswertung Kreuztabellen erstellt und der χ^2 -Test nach Pearson angewendet. War die Voraussetzung dafür nicht gegeben, wurde der exakte Test nach Fisher durchgeführt. Bei der Analyse von metrischen mit ordinalskalierten Variablen wurde die Korrelation (Kendall Tau b) bestimmt. Dabei galten p-Werte unter 0,05 als signifikant und Werte unter 0,01 als hochsignifikant.

4. Ergebnisse

Als Maß für den Grad der Expression wurde ein Immunreaktivitätsscore bestimmt. Dieser berücksichtigt die mittlere Färbeintensität des untersuchten immunreaktiven Gewebes von durchschnittlich 6 neoplastischen und 6 nichtneoplastischen Stanzen pro Patient. In den Tissue Microarrays waren nicht alle Zell- und Gewebearten gleich häufig vertreten.

4.1. Expression der Somatostatin-Rezeptoren im Magen

Die zusammenfassende Darstellung der Somatostatin-Rezeptor Expression findet sich in Tabelle 4.1.a und b.

Tab. 4.1.a: Expression der Somatostatin-Rezeptoren im Magen

	SSTR 1	SSTR 3	SSTR 4	SSTR 5
tumorfremie Schleimhaut				
positive Immunreaktivität IRS (Mittelwert)	161/161(100%) 2,3*	114/170 (67%) 0,3*	78/171 (45%) 0,1*	143/162 (88%) 1*
Magenkarzinom				
Positive Immunreaktivität IRS (Mittelwert)	128/165 (78%) 1,1	6/174 (3%) 0,01	5/175 (3%) 0,01	58/165 (34%) 0,3
Intestinale Metaplasie				
Positive Immunreaktivität IRS (Mittelwert)	58/58 (100%) 2,4*	6/54 (11%) 0,1	1/60 (2%) 0,01	43/53 (81%) 1*

* $p < 0,001$ gegenüber dem Magenkarzinom

Tab. 4.1.b: Expression der Somatostatin-Rezeptoren im Magen: tumorfremie Schleimhaut und Magenkarzinom

		SSTR 1	SSTR 3	SSTR 4	SSTR 5
Tumorfremie Schleimhaut positive Immunreaktivität IRS (Mittelwert)	<i>Corpus</i>	135/136 (99%) 2,2	109/127 (86%) 0,7	39/124 (31%) 0,1	117/129 (91%) 1,9
	<i>Antrum</i>	49/53 (92%) 1,3	1/80 (1%) 0,01	0/81 (0%) 0	4/61 (7%) 0,1
	<i>Foveolen</i>	149/149 (100%) 2,7	27/153 (18%) 0,1	54/156 (35%) 0,2	59/145 (41%) 0,6
Magenkarzinom positive Immunreaktivität IRS (Mittelwert)	<i>diffus</i>	36/57 (63%) 0,6	1/61 (2%) 0	1/62 (2%) 0	11/63 (17%) 0,1
	<i>intestinal</i>	93/108 (86%) 1,4*	5/113 (4%) 0	4/114 (4%) 0	48/103 (47%) 0,4*

* $p < 0,001$ gegenüber dem diffusen Magenkarzinom

In Tabelle 4.1.c sind nur diejenigen Patienten aufgeführt, die eine Beurteilung aller untersuchten Somatostatin-Rezeptoren in neoplastischer und nichtneoplastischer Schleimhaut zuließen.

Tab.: 4.1.c: Expression der Somatostatin-Rezeptoren im Magen

	Anzahl	SSTR1	SSTR 3	SSTR 4	SSTR 5
Magenkarzinom					
Positive Immunreaktivität IRS (Mittelwert)	143	109 (90,2%) 1,1	5 (3,5%) 0	5 (3,5%) 0,01	55 (38,5%) 0,3
<i>diffus</i>	54	35 (64,8%) 0,7	1 (1,9%) 0	1 (1,9%) 0	10 (18,5%) 0,1
<i>intestinal</i>	89	74 (83,1%) 1,3**	4 (4,5%) 0,01	4 4,5%) 0,01	45 (50,6%) 0,4**
tumorfremie Schleimhaut					
positive Immunreaktivität IRS (Mittelwert)	144	144 (100%) 2,3*	98 (68,1%) 0,3*	69 (47,9%) 0,1	128 (88,9%) 1,0*

* $p < 0,001$ gegenüber dem Magenkarzinom, ** $p < 0,001$ gegenüber dem diffusen Magenkarzinom

4.1.1. Expression von SSTR 1

Es zeigte sich, dass SSTR 1 im Tumor, in der intestinalen Metaplasie und im gesunden Gewebe exprimiert wird. Die Analyse zeigte eine zytoplasmatische und membranäre Färbung.

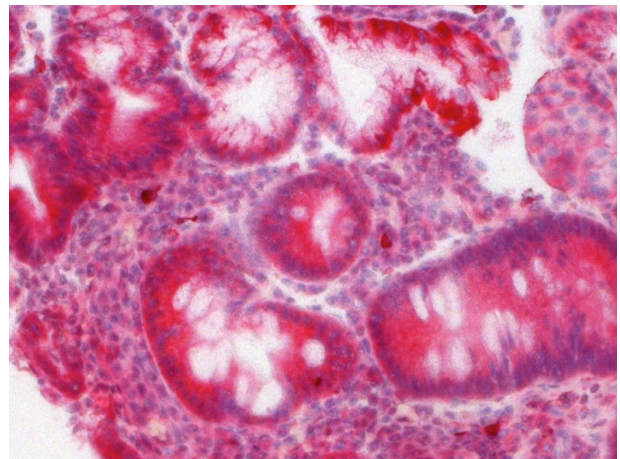
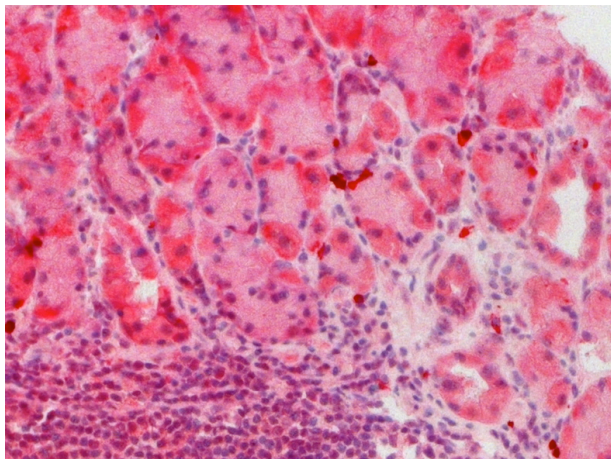
In den Drüsen des normalen Magengewebes war in allen Fällen (100%) eine positive Immunreaktivität mit einer mittleren Stärke von 2,4 zu verzeichnen. Teilweise waren diese Färbungen unterschiedlicher Intensität. Kein Fall wies keine Anfärbung, zwei Fälle eine schwache, 32 Fälle eine mittlere und 127 Fälle eine stark positive Immunreaktion auf.

Das Foveolarepithel zeigte in allen untersuchten Proben (100%) mit einem mittleren IRS von 2,7 eine positive Immunreaktion (141 Fälle (95%) waren stark positiv (2-3)). Bei 33 Fällen war kein Foveolarepithel enthalten. Corpusdrüsen waren in 99% der Fälle positiv und zeigten eine mittlere Färbeintensität von 2,2. Antrumdrüsen waren in 92% der Fälle positiv. Das Ausmaß dieser Reaktion war weniger deutlich und lag im Mittel bei 1,3 (4 Fälle keine, 6 eine schwache, 29 eine mittlere und 14 Fälle eine starke Anfärbung). Die Fibroblasten des nicht neoplastischen Bindegewebes und die glatte Muskulatur von Gefäßen waren bei einigen

Fällen schwach immunreaktiv. Stark positive Immunreaktionen zeigten Granulozyten und Makrophagen der Lamina propria.

128 von 165 (78%) Magenkarzinome wiesen immunreaktive Tumorzellen einer Stärke von 1,1 auf. Tumorzellen vom diffusen Magenkarzinom zeigten eine schwache bis mittelgradige Immunreaktion (im Durchschnitt 0,6) in 63% der Fälle. Tumorzellen des intestinalen Magenkarzinoms ließen eine basal betonte zytoplasmatische Färbung mit vesikulären Mustern erkennen und wiesen im Durchschnitt einen IRS von 1,4 auf (93 (86%) von 108 Fälle waren positiv; 14 negativ, 10 schwach, 56 mittelgradig, 27 stark positiv). Fibroblasten des Tumorstromas zeigten wiederholt eine schwache zytoplasmatische Immunreaktion.

In den Drüsen der metaplastischen Schleimhaut konnte, wie bei der nichtneoplastischen Schleimhaut, in allen untersuchten Fällen eine positive Immunreaktion verzeichnet werden (IRS 2,4; 0 Fälle negativ, 32 Fälle mittelgradig und 18 Fälle stark positiv, 123 Fälle enthielten keine metaplastische Schleimhaut).



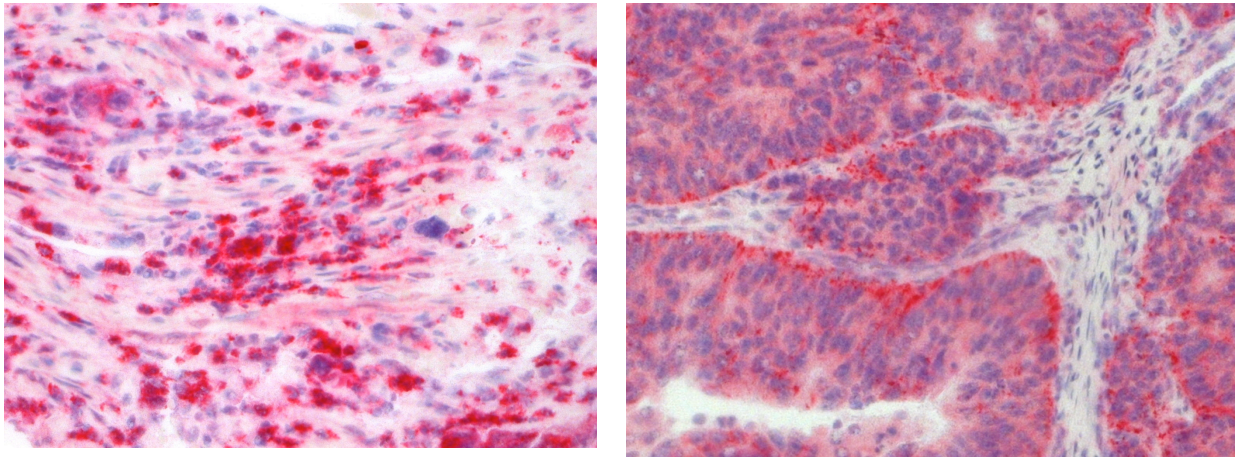


Abb.4.1.1.: Expressionsmuster von SSTR 1 in tumorfreier Schleimhaut (Seite 42 links), intestinaler Metaplasie des Magens (Seite 42 rechts), Magenkarzinom vom diffusen (unten links) und intestinalen Typ (unten rechts). Originalvergrößerung x 400.

4.1.2. Expression von SSTR 3

SSTR 3 wurde nur schwach in tumorfreier Schleimhaut und intestinaler Metaplasie nachgewiesen. Es waren zytoplasmatische und membranäre Färbungen zu erkennen. Das Expressionsmuster wurde in Abbildung 3 festgehalten.

Die Drüsen des normalen Magengewebes wiesen bei 67% der Fälle (114 von 170 Fällen) eine schwach positive Immunreaktivität (0,3) auf. Das Ausmaß der Färbung war in Corpusdrüsen in 86% der Fälle (109 von 127 Fällen) mit einem IRS von 0,7 deutlicher als in den Antrumdrüsen, die nur in einem einzigen Fall immunreaktiv waren (1 (1%) aus 80 Fällen). Das Foveolarepithel zeigte in 27 von 153 Fällen (18%) eine positive Immunreaktivität von maximal 0,1 im Mittel auf. 126 Fälle waren negativ, in 28 Fällen wurde das Foveolarepithel nicht erfasst.

Die Tumorzellen des intestinalen und diffusen Magenkarzinoms waren in allen untersuchten Fällen (100%) immunnegativ. Fibroblasten der nichtneoplastischen Schleimhaut und des Tumorstromas waren unregelmäßig verteilt schwach immunreaktiv.

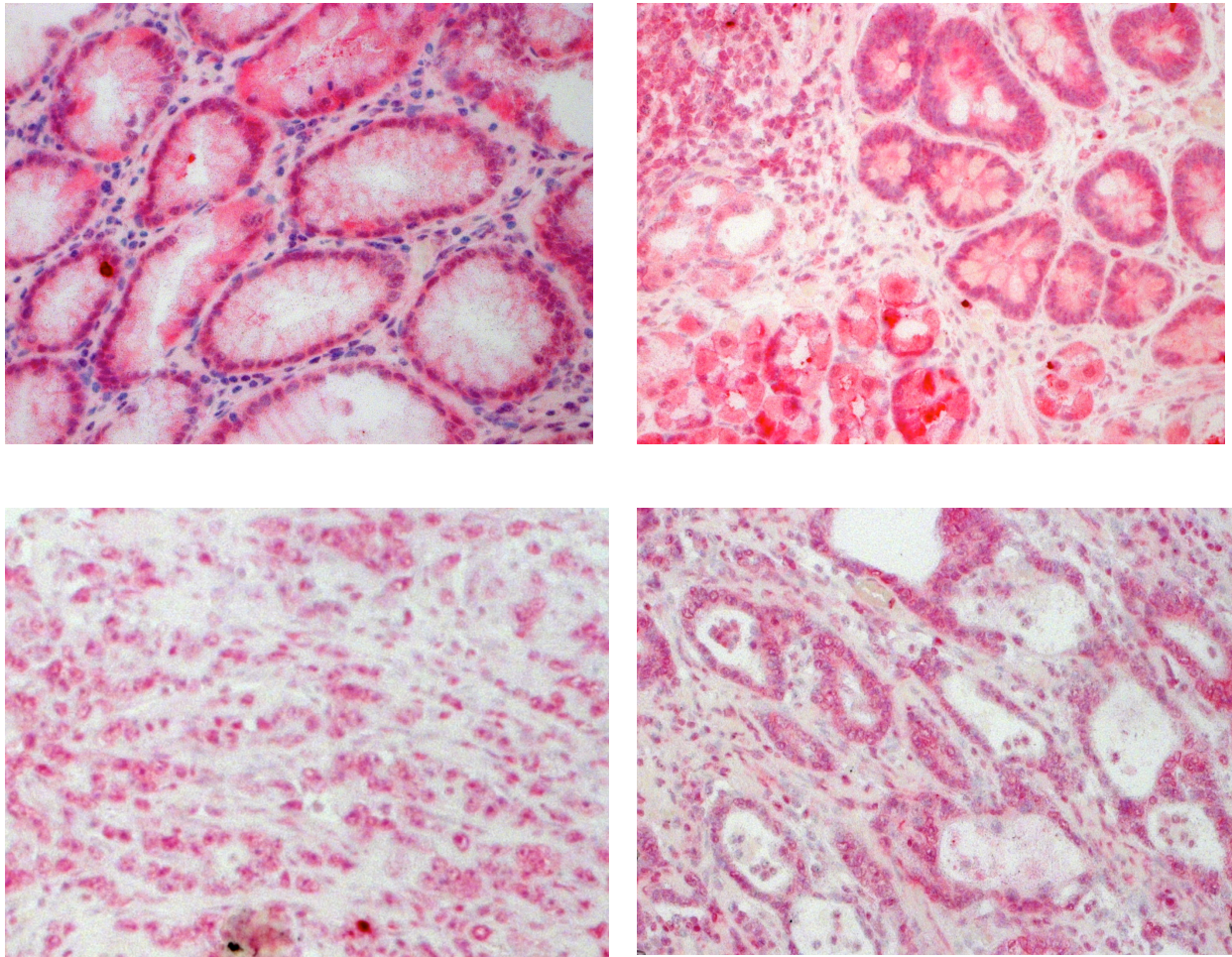


Abb.4.1.2.: Expressionsmuster von SSTR 3 in tumorfreier Schleimhaut (oben links), intestinaler Metaplasie (oben rechts), Magenkarzinom vom diffusen (unten links) und intestinalen Typ (unten rechts). Originalvergrößerung x 400.

4.1.3. Expression von SSTR 4

Für SSTR 4 zeigte sich im gesunden Gewebe und in der intestinalen Metaplasie eine schwache Immunreaktion. Es ließen sich membranäre Färbungen verzeichnen. Bei 171 Patienten konnten Drüsen der tumorfreien Schleimhaut untersucht werden. 45% (78 von 171 Fällen) dieser Fälle wiesen ein mittleren IRS von 0,1 auf (93 Fälle negativ, 78 Fälle schwach positiv). Antrumdrüsen zeigten keine Immunreaktivität. Corpusdrüsen waren in 39 (31%) von 124 Fällen schwach positiv (0,1). Das Foveolarepithel zeigt in 35% (54 von 156) der Fälle ein mittleren IRS von 0,2.

Tumorzellen des intestinalen und diffusen Magenkarzinoms zeigten in nur je 5 Fällen eine schwache Immunreaktion.

Die Drüsen der metaplastischen Schleimhaut waren in nur 1 Fall schwach positiv. In ihr zeigte sich eine zytoplasmatische Färbung. 59 Proben waren negativ und 122 Proben enthielten keine intestinale Metaplasie.

Fibroblasten der nichtneoplastischen Schleimhaut waren in allen Fällen negativ. Dagegen zeigten sich ungleichmäßig verteilt schwach positive Fibroblasten im Tumorstroma und schwach positive glatte Muskelzellen von Gefäßen im malignen Gewebe. Das stärkste Signal (2-3) erhielt man von einzelnen Immunzellen der Lamina propria.

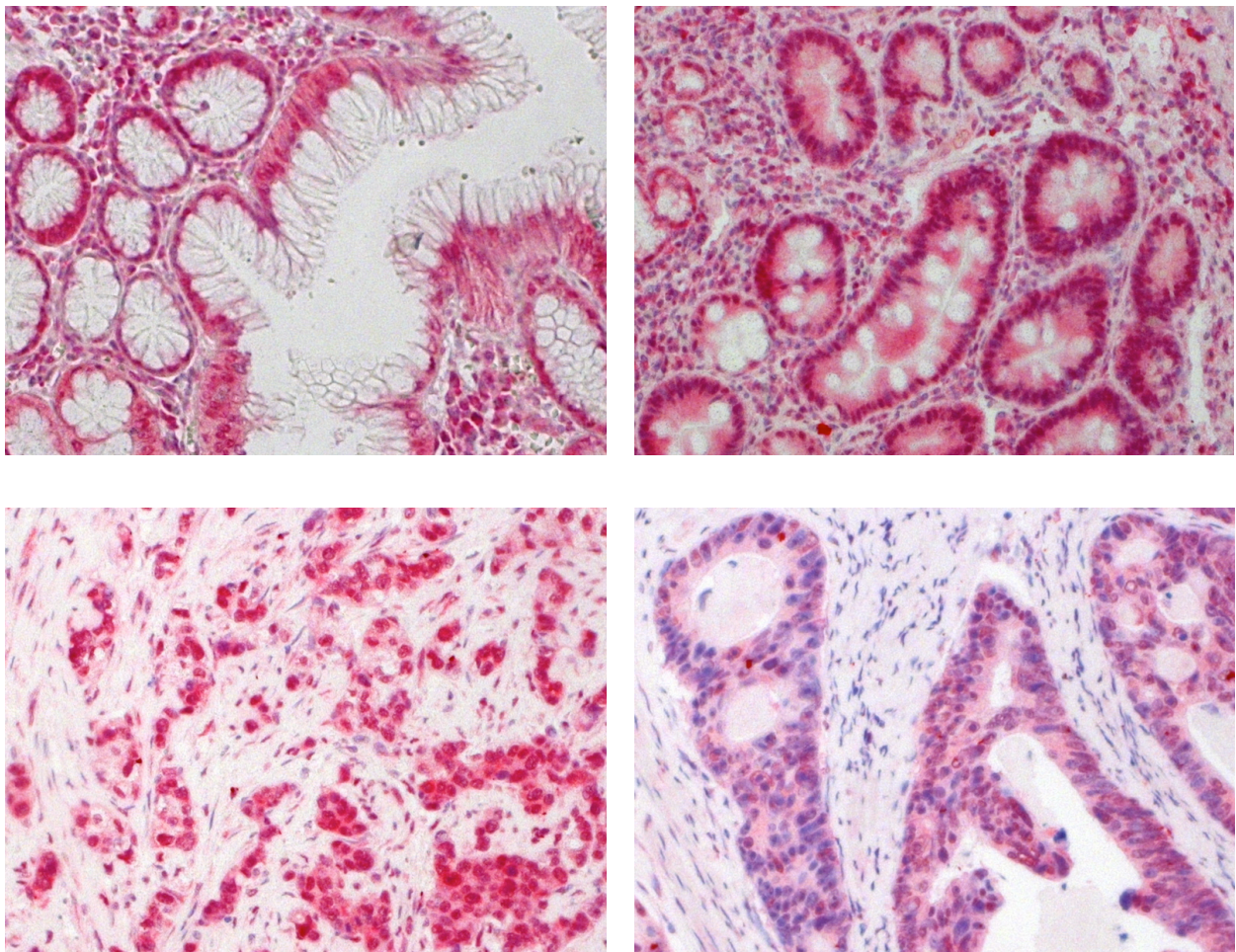


Abb.4.1.3.: Expressionsmuster von SSTR 4 in tumorfreier Schleimhaut (oben links), intestinaler Metaplasie (oben rechts), Magenkarzinom vom diffusen (unten links) und intestinalen Typ (unten rechts). Originalvergrößerung x 400.

4.1.4. Expression von SSTR 5

Es zeigte sich, dass SSTR 5 im Tumor, im gesunden Gewebe und in der intestinalen Metaplasie exprimiert wird. In 88% der Fälle (143 von 162) zeigten Drüsen der tumorfreien Schleimhaut eine positive Immunreaktion (IRS 1,0). Das Ausmaß dieser Reaktion war sehr viel deutlicher im Corpus als im Antrum des Magens zu erkennen. Corpusdrüsen waren in 91% der 129 Fälle mäßig positiv (IRS 1,9; 12 Fälle zeigten keine, 13 Fälle eine schwache, 30 Fälle eine mittlere und 74 Fälle eine starke Anfärbung). Antrumdrüsen zeigten nur eine schwache Immunreaktion (IRS 0,1); 57 Fälle waren negativ, 120 Proben enthielten keine Antrumdrüsen. Es waren sowohl membranäre als auch zytoplasmatische Färbungen des Drüsenkörpers zu erkennen.

Das Foveolarepithel wies einen mittleren IRS von 0,6 auf. 41% der Fälle (59 von 145) waren positiv. Das Epithel der metaplastischen Schleimhaut war bei 81% der Fälle (43 von 53) immunreaktiv (7 schwach positiv, 29 mittelgradig und 7 stark positiv).

58 (34%) von 165 Magenkarzinomen wiesen SSTR 5 immunreaktive Tumorzellen (IRS 0,3) auf (107 Fälle zeigten keine, 38 eine schwache, 15 eine mittlere und 4 Fälle eine starke Anfärbung). Die mittlere Färbeintensität der Tumorzellen war bei den intestinalen Tumoren etwas stärker ausgeprägt (intestinal: IRS 0,4, 47% positive Fälle, 55 Fälle waren negativ; diffus: IRS 0,1, 17% positive Fälle). Die glatte Muskulatur der Lamina muscularis propria zeigte in einigen Fällen eine mittelgradig positive Immunreaktion. Fibroblasten des Tumorstromas waren in wenigen Fällen schwach immunreaktiv.

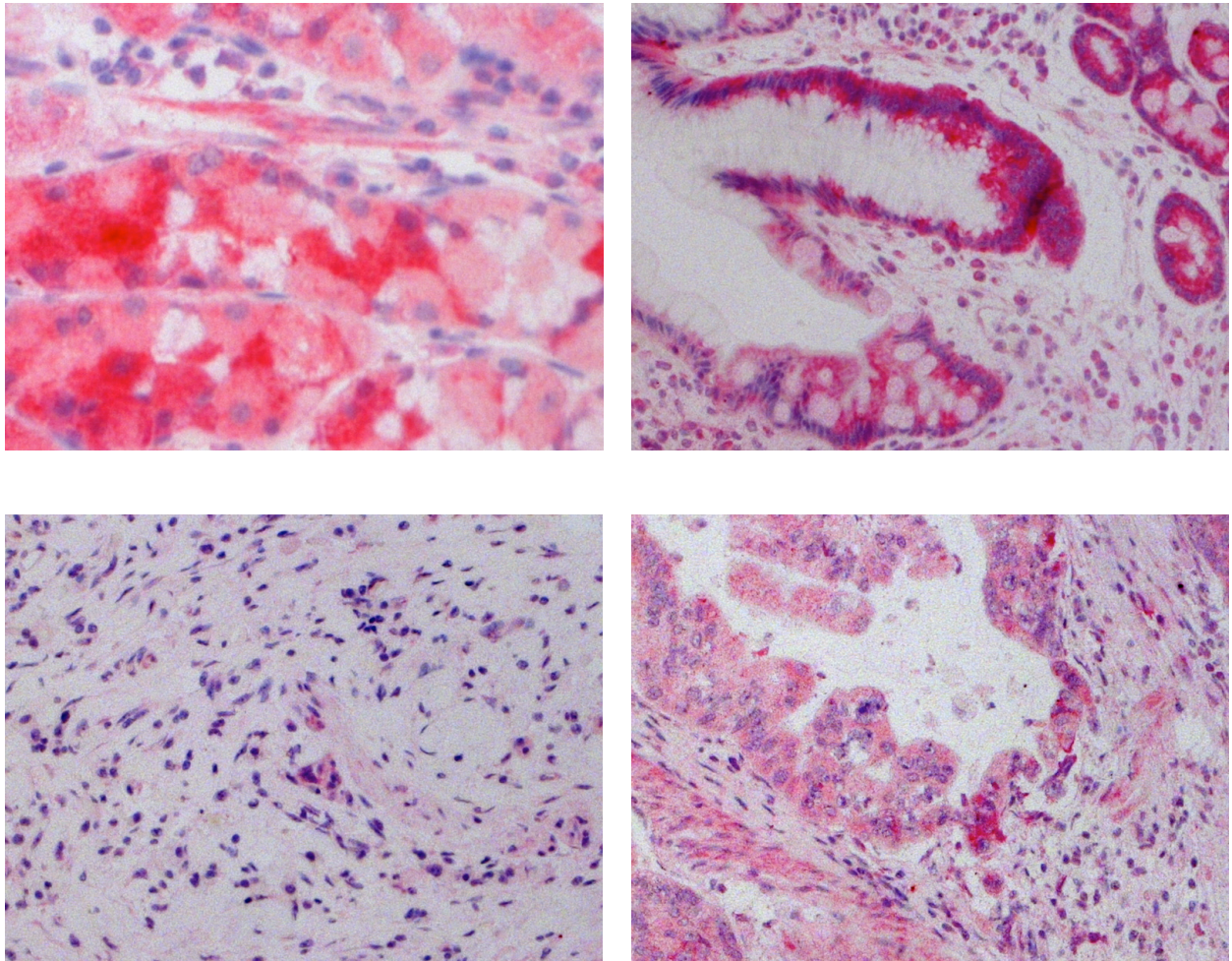


Abb.4.1.4.: Expressionsmuster von SSTR 5 in tumorfreier Schleimhaut (oben links), intestinaler Metaplasie (oben rechts), Magenkarzinom vom diffusen (unten links) und intestinalen Typ (unten rechts). Originalvergrößerung x 400.

4.1.5. Statistische Auswertung – SSTR 1, 3, 4 und 5

In der statistischen Auswertung wurden die Parameter Geschlecht, TNM-Klassifikation, UICC-Stadium und histopathologischer Grad mit der Färbeintensität der Tumorzellen, der tumorfreien und metaplastischen Schleimhaut verglichen. Das Bindegewebe und Tumorstroma wurde auf Grund seiner geringen Anzahl an positiven Fällen nicht verwendet. Das Merkmal Fernmetastasierung (M) besaß durch zahlreiche fehlende Angaben keine Aussagekraft.

SSTR 1

In den 156 betrachteten Stichproben ergab sich in der Auswertung des Grades der Expression von SSTR 1, dass SSTR 1 in der tumorfreien, nicht metaplastischen Schleimhaut signifikant stärker als beim Magenkarzinom ($p < 0,001$) exprimiert war. Im Vergleich von Magenkarzinom und metaplastischer Schleimhaut konnten 55 Stichproben betrachtet werden; hier zeigte sich für SSTR 1 eine signifikant stärkere Expression in der intestinalen Metaplasie ($p < 0,001$). Kein statistisch signifikanter Unterschied war im Vergleich von tumorfreier und metaplastischer Schleimhaut ($p = 0,1$) zu finden. Beim Magenkarzinom exprimierten Tumoren vom intestinalen Typ signifikant stärker SSTR 1 als die des diffusen Types ($p < 0,001$). Ein Unterschied bezüglich des Geschlechts konnte nicht ermittelt werden ($p = 0,53$).

In den Rangkorrelationsuntersuchungen zeigte sich für das Magenkarzinom eine statistisch signifikante Korrelation für das Primärtumorstadium (Kor $-0,144$, $p = 0,018$) und den Differenzierungsgrad (Kor $-0,304$, $p < 0,001$). Was bedeutet, dass mit zunehmendem T-Stadium bzw. abnehmendem Differenzierungsgrad eine Abnahme der SSTR 1 Expression zu verzeichnen war. Dabei ergab sich in der Varianzanalyse der mittleren Expressionsstärke für das histopathologische Stadium G2 (mäßig differenziert) eine signifikant stärkere Expression von SSTR 1 gegenüber den undifferenzierten (G4) Magenkarzinomen. Eine Beziehung zum Metastasierungsstatus in regionären Lymphknoten und dem UICC-Stadium konnte nicht ermittelt werden.

SSTR 3

In den 167 betrachteten Stichproben ergab sich in der Auswertung des Grades der Expression von SSTR 3, dass SSTR 3 in der nichtneoplastischen Schleimhaut signifikant stärker als in der metaplastischen Schleimhaut ($p < 0,05$) und der neoplastischen Schleimhaut ($p < 0,001$) exprimiert war. Die metaplastische Schleimhaut wiederum

exprimierte SSTR 3 signifikant stärker als die neoplastische Schleimhaut des Magens ($p < 0,001$).

Bei den Magenkarzinomen exprimierten Tumoren vom intestinalen Typ signifikant stärker SSTR 3, als die des diffusen Types ($p = 0,049$). Ein Unterschied bezüglich des Geschlechts konnte nicht nachgewiesen werden ($p = 0,32$). Für die SSTR 3 tragenden Tumorzellen zeigte sich keine Korrelation zur Ausbreitung des Primärtumors, der Metastasierung in regionäre Lymphknoten, dem histopathologischen Grad oder dem UICC-Stadium.

SSTR 4

In den 167 betrachteten Stichproben ergab sich in der Auswertung des Grades der Expression von SSTR 4, dass SSTR 4 in der nichtneoplastischen Schleimhaut signifikant stärker als in den Tumorzellen des Magenkarzinoms ($p < 0,001$) exprimiert war. Im Vergleich von Magenkarzinom und metaplastischer Schleimhaut konnte für die 59 Stichproben kein Unterschied ermittelt werden. Dagegen wurde SSTR 4 mit einer mittleren Färbeintensität von 0,07 signifikant stärker in nichtneoplastischer gegenüber metaplastischer Schleimhaut exprimiert ($p < 0,001$). Bezüglich des Tumortyps und Geschlechts konnte kein nennenswerter Unterschied aufgezeigt werden. Die SSTR 4 exprimierenden Tumorzellen zeigten keine Korrelation zur Ausbreitung des Primärtumors, der Metastasierung in regionäre Lymphknoten, dem histopathologischen Grad oder dem UICC-Stadium.

SSTR 5

In den 158 betrachteten Stichproben ergab sich in der Auswertung des Grades der Expression von SSTR 5, dass SSTR 5 in der tumorfreien nicht metaplastischen Schleimhaut signifikant stärker als beim Magenkarzinom ($p < 0,001$) exprimiert war. Im Vergleich von Magenkarzinom und metaplastischer Schleimhaut konnten 51 Stichproben betrachtet werden. Hier zeigte sich für SSTR 5 eine signifikant stärkere Expression in der intestinalen Metaplasie ($p < 0,001$). Kein signifikanter Unterschied war für die tumorfreie und metaplastische Schleimhaut ($p = 0,7$) oder hinsichtlich des Geschlechts ($p = 0,09$) zu ermitteln.

Magenkarzinome vom intestinalen Typ exprimierten SSTR 5 signifikant stärker als die des diffusen Typs ($p < 0,001$). Bezüglich des Primärtumorstadiums und des histopathologischen Grades fand sich mit Zunahme des T-Stadiums (Kor -0,131, $p = 0,047$) bzw. mit Abnahme des Differenzierungsgrades (Kor -0,180, $p = 0,009$) eine signifikant schwächere Ausprägung von SSTR 5. Dabei exprimierten mäßig differenzierte Magenkarzinome signifikant stärker SSTR 5 als schlecht differenzierte. Eine Beziehung zum Nodalstatus oder dem UICC-Stadium konnte nicht gefunden werden.

4.2. Expression der Somatostatin-Rezeptoren im Kolon

Die zusammenfassende Darstellung der Somatostatin-Rezeptor Expression im Kolongewebe findet sich in Tabelle 4.2.a.

Tab. 4.2.a: Expression der Somatostatin-Rezeptoren im Kolon

	SSTR 1	SSTR 3	SSTR 4
tumorfremie Schleimhaut			
positive Immunreaktivität	54/61 (89%)	0/63 (0%)	12/61 (20%)
IS (Mittelwert)	1,2*	0	0,1**
Kolonkarzinom			
positive Immunreaktivität	56/71 (79%)	0/79 (0%)	6/69 (9%)
IS (Mittelwert)	0,6	0	0,02

* $p < 0,001$ ** $p < 0,05$ gegenüber dem Kolonkarzinom

In Tabelle 4.2.b wurden diejenigen Patienten aufgeführt, die eine Beurteilung aller untersuchten Somatostatin-Rezeptoren in neoplastischer und nichtneoplastischer Schleimhaut zuließen.

Tab.4.2.b: Expression der Somatostatin-Rezeptoren im Kolon

	Anzahl	SSTR 1	SSTR 3	SSTR 4
tumorfremie Schleimhaut				
positive Immunreaktivität	52	47 (90,4%)	0 (0%)	12 (23,1%)
IS (Mittelwert)		1,3*	0	0,1**
Kolonkarzinom				
positive Immunreaktivität	61	49 (80,3%)	0 (0%)	5 (8,2%)
IS (Mittelwert)		0,6	0	0,02

* $p < 0,001$ ** $p < 0,05$ gegenüber dem Kolonkarzinom

4.2.1. Expression von SSTR 1

Es zeigte sich, dass SSTR 1 im Tumor und im gesunden Gewebe exprimiert wird. Die Analyse war jedoch vielfach unregelmäßig. Die Färbungen waren sowohl zytoplasmatisch als auch membranständig lokalisiert. Die Kryptenepithelien des normalen Kolongewebes wiesen in 89% der Fälle (54 von 61) eine positive Immunreaktivität mit einer mittleren Stärke von 1,2 auf. Davon waren 7 nicht, 9 schwach, 35 mäßig und 10 Fälle stark positiv. Die stärkste Immunreaktion zeigte sich jedoch in Immunzellen der Lamina propria. Sowohl im gesunden Gewebe als auch im Tumorstroma zeigten diese Zellen die stärkste positive Reaktion. Fibroblasten des nichtneoplastischen Bindegewebes dagegen waren immer negativ.

79% (56 von 71) der Karzinompräparate zeigten eine positive Immunreaktion der Tumorzellen. Das Ausmaß dieser Reaktion war mit einem Mittelwert von 0,6 weniger deutlich, als das des gesunden Gewebes (keine: 15, schwache: 33, mittlere: 21 und starke Anfärbung: 2 Fälle). Die Fibroblasten des Tumorstromas waren auch diesmal hauptsächlich negativ. Schwache positive Markierungen erschienen auf Grund der Unregelmäßigkeit als nicht verlässlich. Die glatte Muskulatur kleiner Gefäße ließ gelegentlich eine positive Immunreaktion im gesunden und malignen Gewebe erkennen.

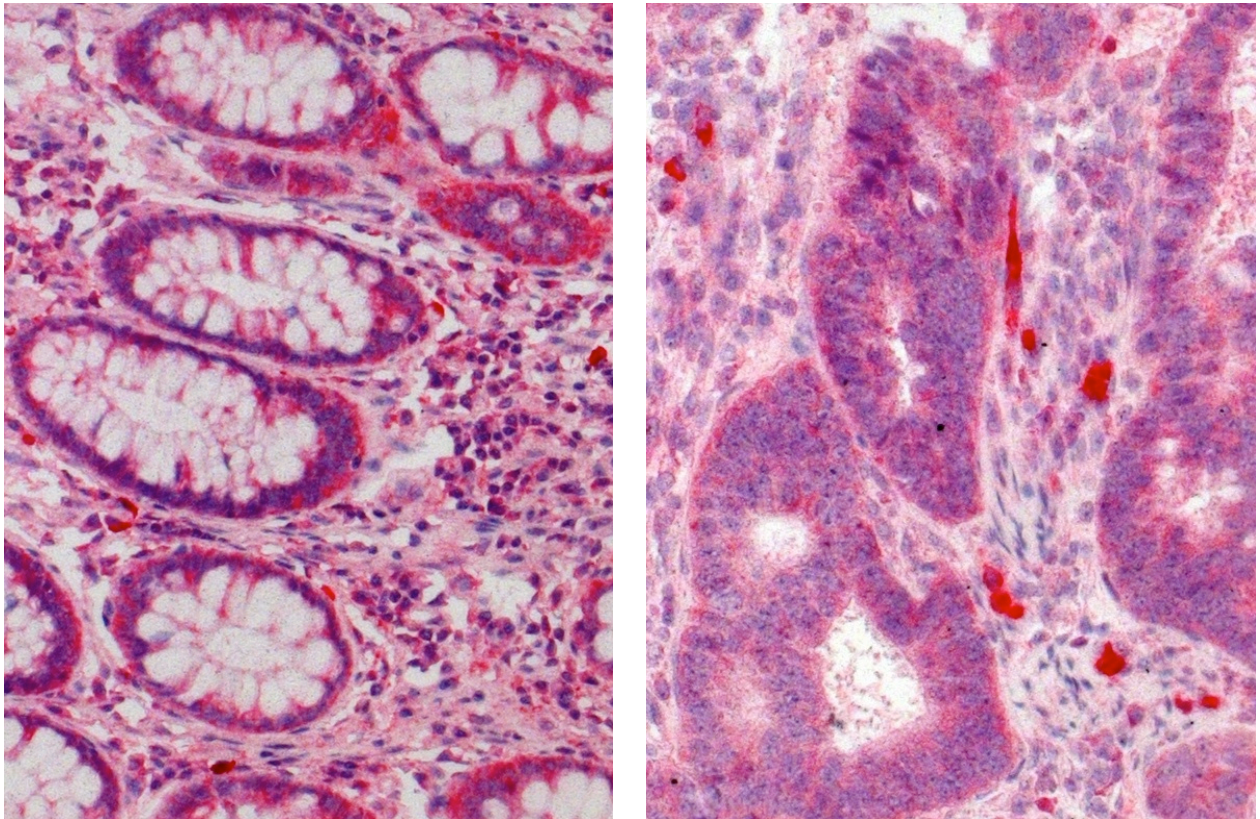


Abb.4.2.1.: Expressionsmuster von SSTR 1 in tumorfreier Schleimhaut (links) des Kolons, Kolonkarzinom (rechts). Originalvergrößerung x 400.

4.2.2. Expression von SSTR 3

Die tumorfreie Schleimhaut zeigte in allen untersuchten Fällen (100%) Immunnegativität. Sowohl an der apikalen Membran und der luminalen Oberfläche als auch an der regenerativen Zone der Kolonkrypten ließ sich keine Expression verzeichnen. Das korrespondierende neoplastische Gewebe, wie Tumorzellen und Fibroblasten des Tumorstromas, war ebenfalls negativ. Die Abbildung 4 stellt tumorfreie Schleimhaut (links) und Kolonkarzinom (rechts) dar.

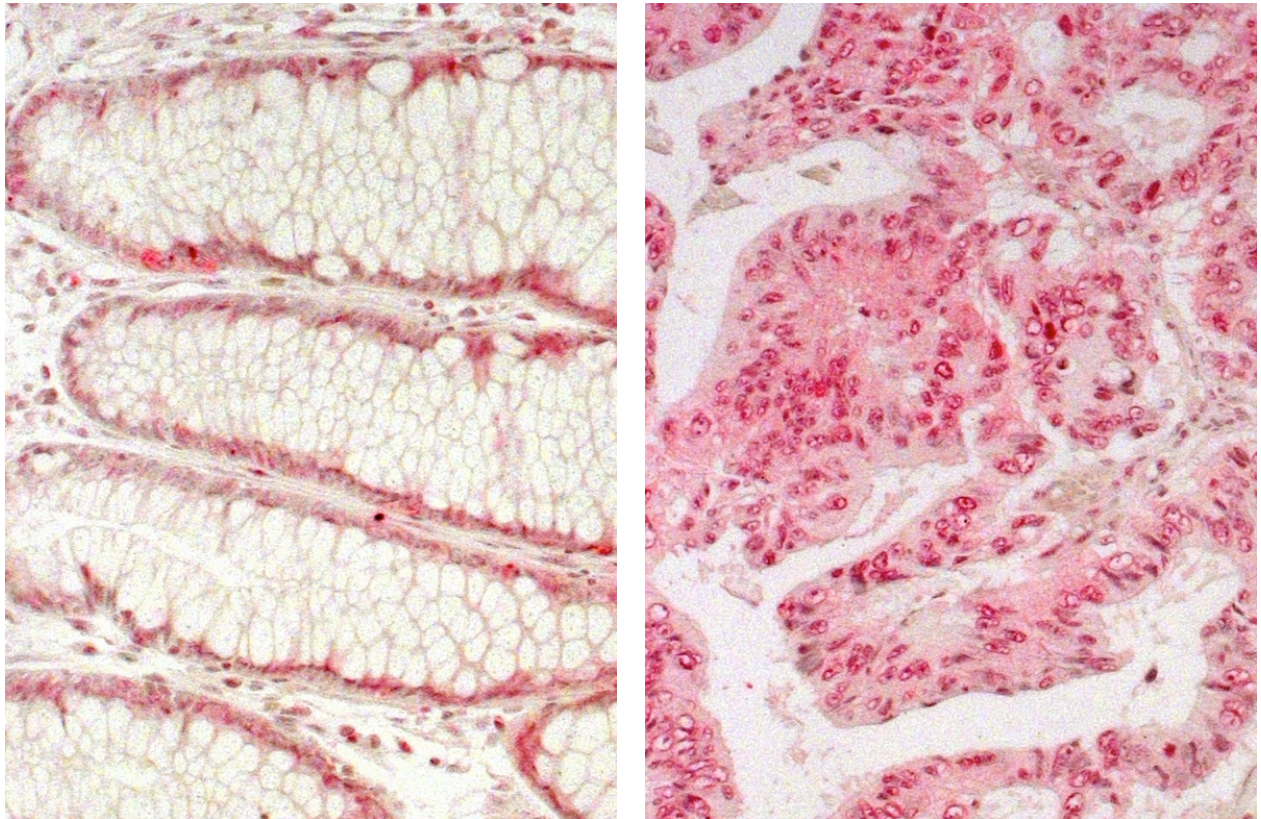


Abb.4.2.2.: Expressionsmuster von SSTR 3 in tumorfreier Schleimhaut (links) des Kolons, Kolonkarzinom (rechts). Originalvergrößerung x 400.

4.2.3. Expression von SSTR 4

Es zeigte sich, dass SSTR 4 im Tumor und im gesunden Gewebe des Kolons exprimiert wird. Intrazytoplasmatische Färbungen in vesikulären Mustern konnten verzeichnet werden. Die Epithelien der nichtneoplastischen Schleimhaut zeigten in 20% der Fälle (12 von 61) eine schwach positive Immunreaktion, die im arithmetischen Mittel 0,6 betrug. Bis auf 3 mittlere und 9 schwache Anfärbungen waren 49 Fälle negativ. Dagegen zeigten einige Granulozyten innerhalb der Lamina propria moderate SSTR 4 Immunreaktionen.

Die Tumorzellen zeigten in 9% der untersuchten Fälle eine sehr schwache Expression (6 Fälle >0-1); 63 Fälle waren immunnegativ. Innerhalb der inhomogenen Verteilung von SSTR 4 konnte neben der zytoplasmatischen eine membranäre Expression gefunden werden. Fibroblasten des Tumorstromas ließen gelegentlich eine schwach positive Immunreaktion erkennen. Gefäße waren sowohl im Gesunden, als auch im Tumorgewebe immunnegativ.

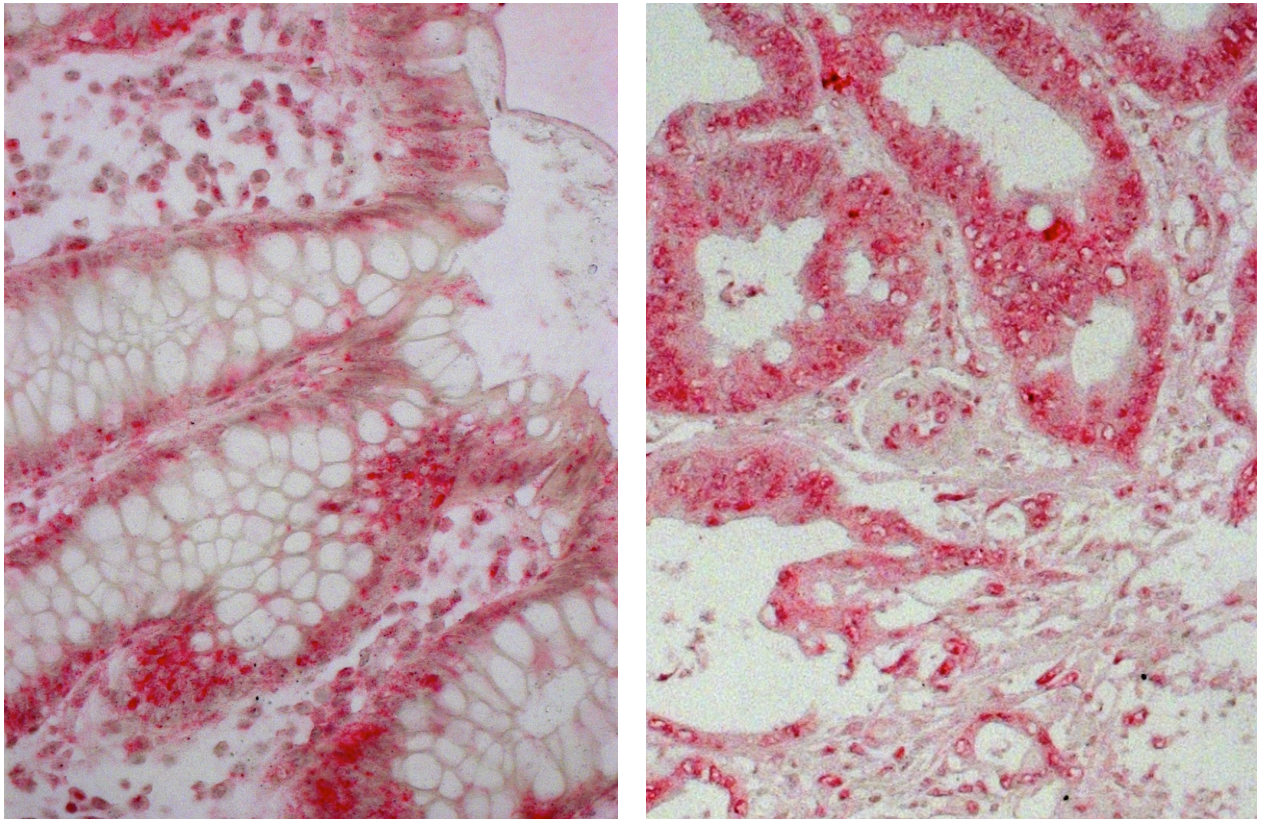


Abb.4.2.3.: Expressionsmuster von SSTR 4 in tumorfreier Schleimhaut (links) des Kolons, Kolonkarzinom (rechts). Originalvergrößerung x 400.

4.2.4. Statistische Auswertung – SSTR 1, 3 und 4

Analog wie beim Magenkarzinom wurden die Parameter Geschlecht, TNM-Klassifikation, UICC-Stadium und histopathologische Differenzierung mit der Färbeintensität von Tumorzellen und der tumorfreien Schleimhaut verglichen. Gefäße, Bindegewebe und Tumorstroma wurden auch in dieser Analyse auf Grund seiner geringen Anzahl an positiven Fällen nicht verwendet. Das Merkmal Fernmetastasierung (M) besaß durch zahlreiche fehlende Angaben keine Aussagekraft.

Für SSTR 1 zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,001$) in der durchschnittlichen Immunreaktivität zwischen der tumorfreien (mittlere Färbeintensität 1,2) und neoplastischen Schleimhaut (0,6). Analog fand sich für die mittlere Immunreaktivität des SSTR 4 in tumorfreier Schleimhaut eine signifikant stärkere Expression im Vergleich zur neoplastischen

Schleimhaut. Für beide Rezeptoren galt eine signifikant stärkere Expression im gesunden, tumorfreien Gewebe gegenüber dem Kolonkarzinom.

Die Parameter Primärtumorstadium, Nodalstatus, UICC-Stadium, histopathologischer Grad und Geschlecht ergaben keine signifikanten Beziehungen.

5. Diskussion

Die fünf Somatostatin-Rezeptor Subtypen gehören zur Familie der inhibierenden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die in benignen und malignen Geweben unterschiedlich exprimiert werden. Studienergebnisse belegen ihre biologische Relevanz für die Tumorbilogie verschiedener Tumoren und humaner Tumorzelllinien, insbesondere der neuroendokrinen Tumoren und der Akromegalie. Papotti et al. untersuchten mittels RT-PCR und Immunhistochemie 81 hormonell aktive und inaktive gastro-entero-pankreatische endokrine Tumoren und ermittelten spezifische Expressionsmuster; SSTR 5 war in Somatostatinstinomen und SSTR 2 in Gastrinomen bzw. Glucagonomen dominant. Ferner zeigten sich heterogene Expressionsmuster in pankreatischen Insulinomen (Papotti et al. 2002). Des Weiteren wurde eine Hochregulation von SSTR 2 und 5 in papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinomen (Klagge et al. 2010), von SSTR 1 in Prostatakzinomen (Kosari et al. 2008), von SSTR 2 Überexpression in Tumorzelllinien der Mamma (He et al. 2009) und von SSTR 3 in Phäochromozytomen (Mundschenk et al. 2003) nachgewiesen, welche perspektivisch einen vielversprechenden Therapieweg für Somatostatin-Analoga zur Behandlung dieser Tumoren darstellen.

Da Goldstandardmethoden, wie die optische Weißlicht-Endoskopie, aber auch Kontrastmittelapplikationen, CT- und MRT-Untersuchungen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität, Untersucher- und Patientencompliance bei kleinen Polypen und morphologisch untypischen Läsionen im Gastrointestinaltrakt durch falsch-negative Ergebnisse oft ihre Grenzen erreichen (Kostenich et al. 2008), ist herauszufinden, ob SSTR ein potentielles

prognostisches und therapeutisches „Target“ zur Identifikation von Magen- und Kolonkarzinomen darstellt, um somit Einblicke in die Karzinogenese und Wachstumsprozesse der Tumoren zu gewinnen und eine frühzeitige Identifikation und Behandlung zu ermöglichen (Reubi 2003).

In dieser Arbeit konnten die Somatostatin-Rezeptoren 1, 3, 4 und 5 in Magenkarzinomen vom intestinalen und diffusen Typ, in tumorfreier und metaplastischer Schleimhaut und SSTR 1 und 4 in tumorfreier und neoplastischer Kolonschleimhaut nachgewiesen werden.

5.1. SSTR und das Magenkarzinom

In der vorliegenden Arbeit war für alle untersuchten Somatostatin-Rezeptoren in der Immunhistochemie eine positive Immunreaktion in der tumorfreien Schleimhaut zu verzeichnen. In den Untersuchungen waren SSTR 1 stark, SSTR 5 moderat und SSTR 3 und 4 nur schwach positiv exprimiert und ließen eine Prädominanz von SSTR 1 (100%) und 5 (88%) vor SSTR 3 (67%) und 4 (45%) erkennen. Bei den Magenkarzinomen zeigten alle untersuchten SSTR eine signifikant verminderte Immunreaktion, jedoch nur die Veränderung von SSTR 1 und 5 wurde als repräsentativ gemindert interpretiert. Ferner zeigten SSTR 1 und 5 signifikant negative Korrelationen hinsichtlich des Primärtumorstadiums und des histopathologischen Grades. Insbesondere war SSTR 1 signifikant schwächer in undifferenzierten (G4) und schlecht differenzierten Adenokarzinomen (G3) gegenüber den mittelgradig differenzierten Tumoren (G2) exprimiert. SSTR 5 exprimierte analog signifikant schwächer in undifferenzierten Karzinomen (G4) gegenüber mäßig differenzierten Adenokarzinomen (G2) des Magens.

SSTR 3 zeigte im Durchschnitt eine schwache Immunreaktion in den Drüsen der tumorfreien Schleimhaut. Die korrespondierenden Präparate des Magenkarzinoms waren fast alle negativ (97%) und ließen in Bezug auf den histopathologischen Differenzierungsgrad keine bedeutende Abstufung zu. Jedoch deutete sich innerhalb des geringen Expressionsniveaus

ein signifikanter Abwärtstrend zwischen den drei Subgruppen: tumorfreie, metaplastische und neoplastische Schleimhaut an, die eine generalisierbare abnehmende Tendenz mit zunehmendem Malignitätsgrad vermuten lassen.

Bisherige Studien am Magenkarzinom und am korrespondierenden gesunden Gewebe liefern widersprüchliche Resultate zum Expressionscharakter der SSTR. In den Untersuchungen von Yamada et al. (1992) wurde nachgewiesen, dass SSTR 1 mRNA allein im humanen Magengewebe zu finden war. Kontroverse Resultate aus Tierstudien stellten jedoch die These zur Diskussion, dass SSTR 1 Haupteffektor in der Signalweiterleitung aller durch Somatostatin aktivierten bzw. inhibierten Funktionen sei. Bruno et al. (1993) und Ralf et al. (1994) fanden, neben SSTR 1, mRNA der Subtypen 2, 3 und 4 bzw. 2, 3 und 5 in der Magenschleimhaut von Ratten.

Die Vermutung, dass weitere Subtypen im humanen Magengewebe exprimiert werden, wurde durch Le Romancer et al. bestätigt. Die Arbeitsgruppe fand mit Hilfe semiquantitativer RT-PCR mRNA aller fünf Rezeptoren im Fundus und Antrum normaler Magenschleimhaut und in der humanen Tumorzelllinie HGT1 des Magens und bewerteten eine mangelnde Sensitivität des von Yamada et al. verwendeten PCR-Verfahrens, um Expressionsunterschiede zu erklären. In vergleichenden Studien an isolierten Magenmukosazellen von Ratten fanden sie indirekte Hinweise für ein selektives Vorkommen der Subtypen in verschiedenen Zellpopulationen. Sie vermuteten SSTR 1 im Antrum, SSTR 2 in ECL-Zellen (enterochromaffin-ähnliche Zellen) des Fundus und SSTR 3 und 4 in Parietalzellen des Magens (Le Romancer et al. 1996).

Jedoch machte es die angewandte Methodik, insbesondere die Verwendung des humanen Biopsie-Homogenats, unmöglich, Angaben über spezifische zelluläre Verteilungsmuster zu treffen. Zudem ist zu kritisieren, dass keine Aussagen hinsichtlich intragastrischer, inflammatorischer Begleitumstände getroffen wurden, nachdem die sechs Proben während der Ösophagogastroskopie von zwei abdominalen Schmerzpatienten gewonnen wurden.

Die Relevanz, Entzündungsprozesse mit in die Auswertung einzubeziehen, wurde durch Varecza et al. in murinem und humanem Lungengewebe belegt. So verzeichneten sie für SSTR 4 in der akuten und chronischen Entzündungsphase einen Expressionsanstieg dieses Subtyps (Varecza et al. 2009). Es ist gut vorstellbar, dass diese Hochregulation analog für Magen- und Kolongewebe gelten könnte. Die Aussage wird jedoch relativiert, wenn man den Expressionsgrad von SSTR 3 im Rahmen *H. pylori* assoziierter Entzündung beobachtet. In Zellen mit oberflächlicher Gastritis war für SSTR 3 keine Hochregulation des Rezeptorgehaltes nachgewiesen worden. Im metaplastisch veränderten Gewebe zeigte sich sogar eine signifikante Verminderung im Vergleich zur normalen Magenmukosa (Stec-Michalska et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich SSTR 1, 3, 4 und 5 hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert. SSTR 1, 3 und 5 wiesen zusätzlich membranäre Anfärbungen auf. Auf zellulärer Ebene beschrieben Janson et al. (1998) und Kulakzis et al. (2002), dass SSTR 2 vornehmlich auf der Plasmamembran von Tumorzellen und SSTR 1, 3 und 5, wie auch in dieser Untersuchung, dagegen zytoplasmatisch lokalisiert seien, was darauf hindeutet, dass es sich um internalisierte Rezeptoren handelt. Die Internalisierung von Rezeptoren gehört zu den kompensatorischen Adaptationsmechanismen, die durch anhaltend hohe Konzentrationen stimulierter Rezeptor-Liganten (Agonisten) ausgelöst werden. Daraufhin wird die Rezeptordichte auf der Zellmembran verringert und steht somit nicht mehr für die Signalübertragung zur Verfügung (Koenig und Edwardson 1997).

Hu et al. legten ihren Studienschwerpunkt auf den SSTR 3 im humanen Magengewebe. Sie zeigten unter Anwendung der RT-PCR und Immunhistochemie in ihren Untersuchungen folgende Verteilung: positive Immunreaktivität in 62% der normalen Magenschleimhaut, 20% in gut-differenzierten und 5% in schlecht-differenzierten Adenokarzinomen. Dabei war eine signifikant stärkere Expression in gesunder Magenschleimhaut zu finden ($p < 0,05$) (Hu et al. 2004).

Ihre Angaben decken sich nur zum Teil mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit. In beiden Untersuchungen war SSTR 3 in tumorfreier Schleimhaut signifikant stärker exprimiert. Jedoch erreichten ihre Magenkarzinompräparate eine höhere SSTR 3 Konzentration und ließen eine Abstufung mit sinkendem Differenzierungsgrad erkennen. Bei mangelnder detaillierter Differenzierung des beurteilten Magenepithels wird nicht klar, inwieweit die metaplastisch veränderte Schleimhaut oder der Drüsenkörper mit in die Beurteilung eingeschlossen worden war. Somit ist nur zu erahnen, ob der gleiche signifikante Abwärtstrend zu finden war und Expressionsunterschiede in der metaplastischen Schleimhaut zu beobachten waren.

Weitere Unterschiede könnten sich durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper und ihrer abweichenden immunhistochemischen Technik erklären. Zum anderen war das Untersuchungskollektiv mit je 40 Proben tumorfreier Schleimhaut und Adenokarzinomen bei Hu et al. im Durchschnitt um 80% kleiner als das dieser Arbeit. Bei den Magenkarzinomen betrachteten sie nur gut bzw. undifferenzierte Adenokarzinome und nicht die vier Differenzierungsgrade.

Stec-Michalska et al. untersuchten aufbauend auf den Resultaten von Hu et al. mittels RT-PCR, SSTR 3 Genexpressionsspiegel in der Antrum- und Corpusschleimhaut von 53 dyspeptischen karzinomfreien Patienten. Um einen repräsentativeren Probenumfang zu erhalten, wurden je drei Biopsien aus Antrum- und Corpusschleimhaut des Magens pro Patient entnommen. Sie fanden heraus, dass unabhängig von der positiven Familienanamnese in allen H. pylori positiven Fällen geringere SSTR 3 mRNA Konzentrationen zu verzeichnen waren. Signifikant am größten war dieser Unterschied im Antrum des Magens. Zudem untersuchten sie, wie bereits zuvor erwähnt, die SSTR 3 Expressionsspiegel im Rahmen der infektionsbedingten histologischen Veränderungen: hier zeigte SSTR 3 vergleichend zur Normalmukosa eine signifikant geringere Expression in der metaplastischen Schleimhaut. Die oberflächliche Gastritis dagegen präsentierte unveränderte SSTR 3 Konzentrationen.

Sie interpretierten ihre Daten wie folgt: die negative Feedback-Schleife, die zwischen der Gastrin- und Somatostatinsekretion besteht, wird durch *H. pylori* Infektionen gestört. Durch die Entzündungsaktivität in der antralen Schleimhaut kommt es zu einer sinkenden Aktivität der Somatostatin sezernierenden APUD-D-Zellen, worauf der Inhibitionseffekt auf die G-Zellen gemindert wird und in einer gesteigerten Gastrinsekretion resultiert (Stec-Michalska et al. 2007). Die Hypergastrinämie ist ein bekannter Risikofaktor in der Karzinogenese von Magenkarzinomen (siehe 1.1.2.) (Moss et al. 1992).

Neben dem apoptotischen Effekt von Somatostatin via SSTR 3 scheint SSTR 5 antiproliferative Effekte zu erzielen. Sharma et al. beschrieben in experimentellen Studien SSTR 5-abhängige zytostatische Effekte, die durch das Retinoblastomprotein induziert werden, wodurch das Zellwachstum durch Verlangsamung des Zellzyklusdurchlaufes gebremst wird (Sharma et al. 1999). Darüber hinaus konnte der antiproliferative Effekt in SSTR 5- und CCK-Rezeptor tragenden CHO-Zellen bewiesen werden. Cholezystokinin, das im Gastrointestinaltrakt u.a. Einfluss auf die Pankreassekretion, Sphinkterkontraktilität und Peristaltik hat, induziert in CHO-Zellen über den CCK-Rezeptor ein Zellwachstum, das unter dem Einfluss eines SSTR 5-affinen Somatostatin-Analogons wieder gestoppt werden konnte (Cordelier et al. 1997). Aufbauend auf diesen Effekten könnte SSTR 5 einen interessanten Ansatz in der Behandlung von SSTR 5 exprimierenden Magenkarzinomen darstellen. Es müssen daher noch weitere Daten über das SSTR 5 Expressionsverhalten in Adenokarzinomen des Magens gesammelt werden, um die Effektivität dieses Markers sowohl im diagnostischen als auch im therapeutischen Rahmen zu prüfen.

Weiterhin wurden in der Literatur geschlechtshormonabhängige Expressionsunterschiede dargestellt. Am Tiermodell fand man heraus, dass bei männlichen Spezies eine höhere Dichte an SSTR 5 im Gehirn und in Pankreasinseln zu finden war (Ramírez et al. 2004). In der vorliegenden Studie jedoch konnten, weder für SSTR 5 noch für die anderen Subtypen geschlechtsabhängige Expressionsunterschiede im Magen oder Kolon gefunden werden.

5.2. SSTR und das kolorektale Karzinom

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der tumorfreien Kolonschleimhaut nur für zwei der drei untersuchten Somatostatin-Rezeptoren eine Immunreaktivität. SSTR 1 war mit einer mäßigen Färbeintensität vor dem schwach exprimierenden SSTR 4 dominant (89% versus 20%). In den Tumorzellen der Kolonkarzinome waren beide SSTR signifikant vermindert exprimiert. SSTR 3 zeigte in 100% der Fälle in tumorfreier und neoplastischer Schleimhaut Immunnegativität. Statistisch fanden sich keine Korrelationen hinsichtlich des Primärtumorstadiums, des Nodalstatus', des histopathologischen Grades oder des Geschlechts.

Primäre Studien von Yamada et al. wiesen SSTR 1- und 2-mRNA im Gastrointestinaltrakt nach. Durch Hybridisierungs- und Blotting-Verfahren zeigten sich unterschiedliche Muster. SSTR 1 mRNA wurde vor allem im Jejunum und Magen und zusammen mit geringen SSTR 2-Konzentrationen im gesunden Kolongewebe und Kolonkarzinom nachgewiesen (Yamada et al. 1992a).

Laws et al. berichten in ihren Untersuchungen dagegen von einer starken SSTR 2 und 5 Expression im Kolongewebe. SSTR 2 war im gesunden und malignen Kolongewebe bei 87% der Fälle vor SSTR 5 positiv. Letzterer zeigte insbesondere im Übergang vom gesunden Gewebe zum Frühkarzinom (Dukes A, B) eine Hochregulation, die sich jedoch nicht bis ins Spätstadium (Dukes C, D) fortsetzte. SSTR 1, 3 und 4 dagegen nahmen durch ihre spärliche und unspezifische Expression einen untergeordneten Rang ein. Für sie zeigte sich, wie auch in diesen Untersuchungen, keine Beziehung zur Tumorgröße oder dem Differenzierungsgrad (Laws et al. 1997).

Vuaroqueaux et al. griffen auf die Methode der RT-PCR zurück und resümierten, dass SSTR 5 > 2 > 1 mRNA am häufigsten von Kolonkarzinomen und in der Staffelung SSTR 2 > 5 > 1 in tumorfreier Schleimhaut exprimiert wurden. Für SSTR 2 und 5 gab es keinen Expressionsunterschied in tumorfreier oder neoplastischer Kolonschleimhaut; der

Expressionsgehalt beider Subtypen blieb unverändert bis zum fortgeschrittenen Karzinom bestehen. SSTR 1 zeigte in Abhängigkeit zur Biopsielokalisation eine signifikant höhere Expressionsstärke in gesunder rechtsseitiger Kolonschleimhaut als in gesunder Rektumschleimhaut. SSTR 3 und 4 waren, übereinstimmend mit Laws et al., schwach exprimiert und wiesen wiederholt keine Korrelationen zum Dukes-Stadium auf (Vuaroqueaux et al. 1999).

In einer späteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe wurden ihre immunhistochemischen Untersuchungen mit Hilfe der in situ-Hybridisierung spezifiziert. Dabei wurde mRNA aller fünf SSTR nachgewiesen. Diesmal zeigte sich SSTR 5 am stärksten in nichtneoplastischer und neoplastischer Kolonschleimhaut. Das Ausmaß der Reaktion wurde mit ansteigendem Malignitätsgrad aller untersuchten Kolonkarzinome deutlicher und konnte zusätzlich in der Untersuchung der epithelialen Tumorzelllinie des Kolons (HT29-D4) bestätigt werden. SSTR 1, 3 und 4 mRNA wurden in moderaten Spiegeln und SSTR 2 mRNA im Gegensatz zu ihren Vorresultaten nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen. Dabei zeigten SSTR 1- und 4-mRNA ähnliche Expressionsmuster in dieser Studie. Sie konnten vor allem in der Lamina propria mucosae und ungleichmäßig verteilt in Krypten nahe stehenden Immunzellen und in Kolonepithelzellen nachgewiesen werden. Schwache SSTR 4 mRNA Spiegel wurde zusätzlich in der Tunica muscularis gezeigt. SSTR 2 mRNA wurde in Epithelzellen, Immunzellen des gesunden Gewebes und in schwachen Konzentrationen homogen in Tumorzellen und dem anliegendem Stroma gefunden. SSTR 3 mRNA wurde in der Submucosa und mit deutlichen Signalen in der anliegenden Tunica muscularis nachgewiesen. Das Kolonkarzinomgewebe war ungleichmäßig und unspezifisch immunreaktiv. Es zeigte positive mRNA-Signale in Tumorzellen und Immunzellen des anliegenden desmoplastischen Stromas. SSTR 5 mRNA wurde mit starker Immunreaktion in Epithelzellen und mäßiger Reaktion in der Tunica muscularis nachgewiesen (Vuaroqueaux et al. 2000).

In den immunhistochemischen Untersuchungen von Qiu et al. wurden kolorektale Adenokarzinome (127 Fälle) und benigne Schleimhautproben (40 Fälle) des Kolons überprüft. Zur Ermittlung der SSTR-Subtypverteilung nutzen sie neben einer abweichenden immunhistochemischen Technik unterschiedliche Antikörper und verschiedene Beobachtungskriterien. Ihr Immunreaktivitätsscore schloss zusätzlich zur Färbeintensität (0 bis 3) den Anteil der positiv gefärbten Zellen pro Präparat in Prozentanteil mit ein. In dieser Arbeit ermittelte sich der Immunreaktivitätsscore aus der mittleren Färbeintensität der großen Anzahl repräsentativer Stenzen pro Patient (durchschnittlich 6) aus einem 82 Personenkollektiv. Trotz all dieser Unterschiede zeigte sich bei Qiu et al. eine Prädominanz des SSTR 1 vor SSTR 5, 2, 4 und 3. SSTR 1 war etwa gleich häufig sowohl beim kolorektalen Karzinom als auch in der tumorfreien Schleimhaut nachgewiesen worden (64,6% versus 52,5%). Zusätzlich ermittelte die Arbeitsgruppe eine signifikant stärkere SSTR 1 Expression für Patienten mit vorhandener regionärer Lymphknotenmetastasierung gegenüber metastasierungsfreien Patienten ($p < 0,05$) und mit fortschreitendem Dukes-Stadium konnten sie eine unrepräsentative Zunahme der SSTR 1 Expression feststellen (Qiu et al. 2006). Die einzigen Übereinstimmungen zu dieser Arbeit konnten im Expressionsverhältnis des SSTR 1 von neoplastischer und tumorfreier Schleimhaut (80% vs. 90%) und einer signifikant höheren Expression in tumorfreier Schleimhaut gefunden werden.

Der fehlende Nachweis von SSTR 3 in dieser Arbeit widerspricht den Resultaten von Qiu et al. Diese Arbeitsgruppe zeigte für SSTR 3 respektive 19% positiv exprimierende kolorektale Karzinome und 31% positive Proben gesunder Kolonschleimhaut mit signifikanter Korrelation zum Dukes-Stadium. Ähnlich wie beim Magenkarzinom (Hu et al. 2004) konnte die Gruppe zusätzlich für kolorektale Karzinome mit niedrigen SSTR 3 Spiegeln einen signifikant höheren proliferativen Index nachweisen (Qiu et al. 2006).

Neben SSTR 3 laufen auch die Resultate für SSTR 4 auseinander. In ihrer Studie war SSTR 4 als einziger Subtyp signifikant stärker beim kolorektalen Karzinom als in der tumorfreien Schleimhaut exprimiert ($p < 0,05$). Hinsichtlich des histopathologischen Grades wurde eine

signifikant stärkere Expression in mäßig differenzierten Adenokarzinomen als in den schlecht differenzierten kolorektalen Adenokarzinomen gefunden (Qiu et al. 2006).

Die Resultate der untersuchten und beschriebenen SSTR-Subtypen waren in den aufgeführten Arbeiten größtenteils sehr inkonstant und widersprüchlich. SSTR 2, 5 und 1 scheinen jedoch vordergründig beim kolorektalen Karzinom exprimiert zu werden, wogegen SSTR 3 eher im gesunden Gewebe anzutreffen ist. Es gibt Hinweise, dass der Verlust einzelner SSTR-Subtypen im Verlauf der Karzinogenese mit Anhäufung genetischer Schäden das Zellwachstum beschleunigt. So zeigte sich für SSTR 2- und 3-freie Zellen im Gegensatz zu SSTR 2- und 3-exprimierenden Zellen ein signifikant höherer proliferativer Index, gemessen an der Ki-67 Immunpositivität (Qiu et al. 2006).

Im Allgemeinen sollte als mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse die grundsätzliche Heterogenität der Kolonkarzinome und ihrer Tumorzellen in Abhängigkeit zur Biopsielokalisation, zum Primärtumorstadium und zur möglichen begleitenden Grunderkrankung nicht vergessen werden und größtenteils wurden keine Angaben gemacht, ob eine Vorbehandlung der Karzinome im Sinne von Operationen oder Chemotherapien stattgefunden hat, die einen Einfluss auf das Expressionsmuster der SSTR ausgeübt haben könnten.

Daneben liegen weitere Gründe in der unterschiedlichen Methodik. RT-PCR-Untersuchungen kann es trotz hoher Sensitivität zum Nachteil werden, dass es durch Pseudogen-Expressionen zu einem Anstieg von PCR-Produkten kommt, deren Einfluss und Funktionalität auf die SSTR bisher nicht geklärt sind. Zudem könnten Rezeptoren tumornaher bzw. tumorassoziierter Strukturen, wie zum Beispiel Blutgefäße, nachgewiesen worden sein. Das Vorkommen von SSTR 1, 2 und 5 in wachsenden Endothelien peri- und intratumoraler Gefäße wurde bereits durch Denzler et al. (1999) und Vuaroqueaux et al. (2000) beschrieben.

Weitere Diskrepanzen begründen sich durch unterschiedlich verwendete Reagenzien sowie durch die unterschiedlichen Stichprobengrößen der jeweiligen Studien, bei denen zum Teil um bis zu 80% kleinere Stichprobenumfänge im Vergleich zum Patienten- und Probenumfang der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

5.3. SSTR in der Diagnostik und Therapie

Somatostatin-Rezeptor tragende Tumoren und Metastasen können *in vivo* über ein dem Körper injiziertes, radioaktiv markiertes Somatostatin-Analogon mittels der Szintigrafie dargestellt werden. Dabei bindet das radioaktiv markierte Analogon am Beispiel von 11-In-Penetretotid an die SSTR 2 und 5. Die Sensitivität dieser Untersuchung liegt für Karzinoide bei 86 bis 95%, für Gastrinome, VIP sezernierende Tumoren (vasoaktives intestinales Peptid), Glucagonome und für funktionslose neuroendokrine Tumoren bei 75% bis 100% und für Insulinome bei ca. 50% bis 60% (de Herder et al. 2005).

Solide Tumoren, wie Magen-, Kolon, Bronchialkarzinome mittels dieser Technik analog zu erkennen, gelang Kostenich et al. experimentell im Maus-Modell. Die Gruppe stellte humane SSTR-exprimierende Lungenkrebszelllinien unter Nutzung eines neuen fluoreszierenden SST-Analogons *in vivo* dar (Kostenich et al. 2005). In einer weiteren Studie der gleichen Arbeitsgruppe wurde unter einem angepassten Versuchsaufbau die Visualisierung von humanen Tumorzelllinien (HT-29) des Kolons im Maus-Modell wiederholt. Hierbei gelang nach spätestens 24 Stunden eine sich klar abgrenzende *in vitro* und *in vivo* Darstellung der fremdtransplantierten Tumorzellen gegenüber dem korrespondierenden gesunden Kolongewebe. Als in Frage kommende Zielrezeptoren vermuteten sie in Anbetracht der vorherrschenden Literatur die Beteiligung von SSTR1 und/ oder 5 in den Tumorzellen (Laws et al. 1997, Qiu et al. 2006) und SSTR 1, 2 und/ oder 5 in Gefäßen (Denzler et al. 1999, Vuaroqueaux et al. 2000). Dabei erklären die Autoren die klare Abgrenzbarkeit von Tumorzellen und Gefäßen durch eine während des malignen Entartungsprozesses

stattfindende SSTR-Hochregulation. Unter dem verwendeten Konjugat [3207-86] zeigte sich beim Nager keine erhöhte Intoleranz, Toxizität oder Mortalität, sodass dieses Agens eine vielversprechende Option in den Screening-Methoden humaner kolorektaler Karzinome darstellen könnte (Kostenich et al. 2008).

Vielerlei Forschungsergebnisse haben das allgemeine Interesse an einem nützlichen onkologischen Einsatz der SST-Analoga deutlich wachsen lassen: Nachweis unterschiedlichster SSTR positiver humaner Tumoren, sst-14 bedingter antiproliferativer Effekt in fibromatösen Tumorzellen *in vitro* (Mascardo und Sherline 1982) und Ocreotid induzierte Größenminderung von Hypophysentumoren (Srikant 1995). In Anbetracht unserer Ergebnisse und der vorliegenden Literatur zeigte sich für einige Magen- und Kolonkarzinome eine fortbestehende Expression der SSTR 1, 2 und 5 und zum Teil auch SSTR 4 im Tumorgewebe. Daher sollten Somatostatin-Analoga, welche eine hohe Affinität für SSTR 1, 2 und 5 aufweisen, als potentielle Kandidaten in der Behandlung von Magen- bzw. Kolontumoren mit einbezogen werden. Vor allem wegen der antiproliferativen Wirksamkeit von SSTR 5 stellt dieser Rezeptor eine potente Option in der frühzeitigen Behandlung von Karzinomen dar. Dabei könnte die Therapie durch eine vorangestellte immunhistologische Bestimmung des Rezeptorstatus die Therapie lenken.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der Immunhistochemie und mit Hilfe der Tissue Microarrays untersucht, ob die Somatostatin-Rezeptoren (SSTR) 1, 3, 4 und 5 differentiell in Magen- und SSTR 1, 3 und 4 in Kolonkarzinomen exprimiert werden. Für die mikroskopische Auswertung standen durchschnittlich je 6 benigne und maligne, formalinfixierte, paraffineingebettete Magengewebebeispiele von jeweils 181 Patienten und äquivalent durchschnittlich je 6 benigne und maligne Kolongewebebeispiele von jeweils 82 Patienten zur Verfügung. Diese wurden nach Auswertung mit der Laurén-Klassifikation, der Infiltrationstiefe der lokalen Tumorausbreitung, dem Nodalstatus, dem histopathologischen Differenzierungsgrad, dem UICC-Stadium und dem Geschlecht korreliert. Akzidentelle Färbungen von Zellen wurden durch den Nachweis der Spezifität der Immunreaktion anhand von Kontrollen und durch den Prozess der Hitzedemaskierung mit Zerstörung endogener alkalischer Phosphatasen weitestgehend ausgeschlossen.

In der tumorfreien Schleimhaut des Magens waren die Somatostatin-Rezeptoren in der Rangfolge SSTR 1 > 5 > 3 > 4 exprimiert. SSTR 1 und 5 zeigten dabei einen mittleren IRS von 2-3, SSTR 3 und 4 eine schwache bis mäßige Immunpositivität, während alle Subtypen im Bindegewebe und der glatten Muskulatur nur vereinzelt in meist schwacher Intensität nachgewiesen wurden. Die Subtypen 1, 3 und 5 waren hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert und zeigten wenige membranäre Anfärbungen, was daraufhin deutet, dass es sich hierbei möglicherweise um internalisierte Rezeptoren handelt.

Eine differentielle Expression konnte in den Tumorzellen der Magenkarzinome nachgewiesen werden. Auch in diesen Proben zeigten sich SSTR 1 vor SSTR 5, SSTR 3 und SSTR 4 dominant, jedoch waren alle SSTR-Subtypen im Vergleich zur gesunden Magenschleimhaut hochsignifikant schwächer exprimiert ($p < 0,001$). SSTR 1 und 5 ließen zytoplasmatische Anfärbungen erkennen, SSTR 1 insbesondere eine basale Betonung in vesikulären Mustern. SSTR 3 und 4 zeigten dagegen nur vereinzelt Immunreaktionen. Die Fibroblasten des Tumorstromas waren unverändert schwach und nur heterogen

exprimierend gefunden worden. Allerdings war auffällig, dass Makrophagen und Granulozyten wiederholt die stärkste Expression (IRS 2-3) von SSTR 1 und 4 in sowohl gesundem, als auch malignen Gewebe erkennen liessen.

In der metaplastischen Schleimhaut waren für SSTR 1 und 5, bis auf einen leichten Anstieg des IRS, keine signifikanten Veränderungen im Expressionsmuster im Vergleich zum gesunden Magengewebe zu finden. SSTR 3 dagegen zeigte seltene schwache Färbungen, SSTR 4 war in nur einem Fall positiv.

Magenkarzinome vom intestinalen Typ exprimierten hochsignifikant stärker SSTR 1 und 5 als Magenkarzinome vom diffusen Typ ($p < 0,001$). Außerdem konnte die Expression von SSTR 1 und 5 mit dem T-Stadium ($p = 0,018$; $p = 0,047$) und dem histopathologischen Differenzierungsgrad ($p < 0,001$; $p = 0,009$) negativ korreliert werden. Überdies war SSTR 1 signifikant schwächer in schlecht (G3) und undifferenzierten Karzinomen (G4) als in mäßig differenzierten Tumoren (G2) und SSTR 5 analog signifikant schwächer in schlecht differenzierten (G3) als in mäßig differenzierten (G2) Tumoren nachgewiesen worden.

In der tumorfreien Schleimhaut des Kolons als auch in den Tumorzellen der Kolonkarzinome war SSTR 1 annähernd gleich häufig wie SSTR 4 exprimiert worden. Sie zeigten membranäre und zytoplasmatische Immunreaktivität, wogegen SSTR 3 weder im gesunden noch malignen Kolon nachgewiesen werden konnte. Damit grenzt sich dieser Subtyp deutlich gegenüber dem Magengewebe ab sodass SSTR 3 als Indikator für Adenokarzinome des Magens dargestellt werden kann. In Anbetracht der widersprüchlichen Literatur jedoch lassen sich die vorliegenden Ergebnisse des SSTR 3 nicht vereinbaren. Daher wird es notwendig sein, im Hinblick auf seine biologischen und pathophysiologischen Eigenschaften (Apoptoseeinleitung, Hemmung der Zellproliferation und Angiogenese) weitere Daten zu sammeln, um eine Entscheidung über seine Nutzung als diagnostischen Marker bzw. therapeutische Zielstruktur zu treffen.

Wie auch schon beim Magenkarzinom wurde für Granulozyten und Makrophagen die stärksten SSTR 1 positiven Reaktionen beobachtet, in der glatten Muskulatur der Gefäße gelegentlich eine schwache Immunreaktion.

Insgesamt waren SSTR 1 und 4 in tumorfreier Schleimhaut signifikant stärker ausgeprägt als beim Kolonkarzinom ($p < 0,001$ vs. $p < 0,05$). Weitere Beziehungen hinsichtlich Geschlecht, Nodalstatus und UICC-Stadium konnten wie beim Magenkarzinom nicht festgestellt werden.

Somit zeigte sich für beide Tumoren eine verminderte Expression der SSTR im Vergleich zum korrespondierenden gesunden Gewebe. Das könnte erklären, warum Somatostatin bzw. Somatostatin-Analoga mit Verlust ihrer Zielstrukturen über intrazelluläre Second Messenger Prozesse wie Angiogenese, Proliferation, Differenzierung und Apoptose nicht mehr beeinflussen können und somit die Anhäufung zellulärer Schäden im karzinogenen Prozess gefördert wird.

SSTR 1 und 5 könnten eine wichtige Rolle in der Tumorbilogie des Magens und SSTR 1 beim Kolon spielen und als Indikator in der Karzinogenese von Magen- bzw. Kolontumoren verwendet werden. Besonders durch das praxisnahe immunhistochemische Verfahren könnten diese Rezeptoren in der Routine als Screening Marker, insbesondere als prädiktive Biomarker beim Magenkarzinom, eingesetzt werden.

Literaturverzeichnis

1. Adams RL, Adams IP, Lindow SW, Atkin SL. Inhibition of endothelial proliferation by the somatostatin analogue SOM230. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2004 Oct;61(4):431-6
2. Alberts SR, Cervantes A, van de Velde CJH; Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment; *Annals of Oncology* 12(2):ii31-ii36, 2003
3. Aellen JP, Hathway GJ, Clarke NJ, Jowett MI, Topps S, Kendrick KM, Humphrey PP, Wilkinson LS, Emson PC. Somatostatin receptor 2 knockout/lacZ knockin mice show impaired motor coordination and reveal sites of somatostatin action within the stratum. *Eur J Neurosci*. 2003;17:1881-95
4. Arnold R, Trautmann ME, Creutzfeldt W, Benning R, Benning M, Neuhaus C, Juergensen R, Stein K, Schaefer H, Bruns C, Dennler HJ. Somatostatin analogue octreotide and inhibition of tumour growth in metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumours. *Gut*. 1996 Mar;38:430-438
5. Baumeister H, Kreuzer OJ, Roosterman D, Schafer J, Meyerhof W. Cloning, expression, pharmacology and tissue distribution of the mouse somatostatin receptor subtype 5. *J Neuroendocrinol*. 1998 Apr;10(4):283-90
6. Becker N; Epidemiology of Colorectal Cancer; *Radiologie* 2003; 43:98-104
7. Bell GI, Reisine T. Molecular biology of somatostatin receptors. *Trends Neurosci*. 1993 Jan;16(1):34-8
8. Bingham SA, Day NE, Luben R, Ferrari P, Slimani N, Norat T, Clavel-Chapelon F, Kesse E, Nieters A, Boeing H, Tjønneland A, Overvad K, Martinez C, Dorronsoro M et al. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*. 2003 May 3;361(9368):1496-501
9. Bollschweiler E, Leers J, Hölscher AH, Epidemiology of Esophageal and Gastric Cancer, *Gastroenterologie* 2009, 4(3): 193-201
10. Boese-Landgraf J, Epidemiologie, Vorstufe und Pathogenese des kolorektalen Karzinoms, *Onkologie* 1998 (Suppl)4:S2-S4
11. Borrmann R; Geschwülste des Magens und Duodenums. In: Henke F and Lubarsch O (eds.) *Handbuch der Speziellen Pathologischen Anatomie und Histologie*. Springer Verlag: Berlin, 1926
12. Boyle P, Levin B, World Cancer Report 2008, IARC Press Lyon 2008
13. Breder CD, Yamada Y, Yasuda K, Seino S, Saper CB, Bell GI. Differential expression of somatostatin receptor subtypes in brain. *J Neurosci*. 1992 Oct;12(10):3920-34
14. Brelsford M, Beute TC. Preventing and managing the side effects of isotretinoin. *Semin Cutan Med Surg*. 2008 Sep;27(3):197-206
15. Brenner H., Rothenbacher D., Arndt V., Epidemiology of Stomach Cancer, *Methods Mol Biol*. 2009; 472:467-77

16. Bruno JF, Xu Y, Song J, Berelowitz M. Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinology*. 1993 Dec;133(6):2561-7
17. Brzozowski T, Konturek PC, Mierzwa M, Drozdowicz D, Bielanski W, Kwiecien S, Konturek SJ, Stachura J, Pawlik WW, Hahn EG, Effects of probiotics and triple eradication therapy on the cyclooxygenase (COX)-2 expression, apoptosis and functional gastric mucosal impairment in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils, *Helicobacter*. 2006 Febr.;11(1):10-20
18. Cardoso A, el Ghamrawy C, Gautron JP, Horvat B, Gautier N, Enjalbert A, Kranic S. Somatostatin increases mitogen-induced IL-2 secretion and proliferation of human Jurkat T-cells via sst3 receptor subtype. *J Cell Biochem*. 1998 Jan 1;68(1):62-73
19. Caron P, Buscail L, Beckers A, Estève JP, Igout A, Hennen G, Susini C. Expression of Somatostatin Receptor SST4 in Human Placenta and Absence of Octreotide Effect on Human Placental Growth Hormone Concentration during Pregnancy. *J Clin Endocrinol and Metabolism*. 1997;82(11):3771-6
20. Chen L, Fritzpatrick VD, Vandlen RL, Tashjian AH Jr. Both overlapping and distinct signaling pathways for somatostatin receptor subtypes SSTR 1 and 2 in pituitary cell. *J Biol Chem*. 1997;272:18666-72
21. Coggon D, Barker DJ, Cole RB, Nelson M; Stomach cancer and food storage; *J Natl Cancer Inst*. 1989 Aug 2;81(15):1178-8
22. Coleman MP, Gatta G, Verdecchia A, Estève J, Sant M, Storm H, Allemani C, Ciccolallo L, Santaquilani M, Berrino F, EURO CARE Working Group. EURO CARE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century. *Ann Oncol*. 2003;14 Suppl 5:v128-49
23. Cordelier P, Estève JP, Bousquet C, Delesque N, O'Carroll AM, Schally AV, Vayess N, Susini C, Buscail L. Characterisation of the antiproliferative signal mediated by the somatostatin receptor subtype sst5. *Proc Natl Acad Sci*. 1997 Aug;94:9343-48
24. Corness JD, Demchyshyn LL, Seeman P, Van Tol HH, Srikant CB, Kent G, Patel YC, Niznik HB. A human somatostatin receptor (SSTR3), located on chromosome 22, displays preferential affinity for somatostatin-14 like peptides. *FEBS Lett*. 1993 Apr 26;321(2-3):279-84
25. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer W, A model for gastric cancer epidemiology, *Lancet*, 1975 Jul 12;2(7924):58-60
26. Correa P, *Helicobacter pylori* and gastric cancer: state of the art; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996 Jun;5(6):477-81
27. Correa P, Is gastric cancer preventable?, *Gut*, 2004;53:1217-1219
28. Corley DA, Kubo A, Zhao W, Abdominal obesity and the risk of esophageal and gastric cardia carcinomas, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Febr;17(2):352-8
29. Crabtree JE, Xiang Z, Lindley IJ, Tompkins DS, Rappuoli R, Covacci A, Induction of interleukin-8 secretion from gastric epithelial cells by a *cagA* negative isogenic mutant of *Helicobacter pylori*. *J Clin Pathol*. 1995 Oct;48(10):967-9

30. Crew KD, Neugut AI, Epidemiology of gastric cancer, *World J Gastroenterol* 2006 Jan 2;12(3):354-362
31. De Herder WW, Lamberts SW. Somatostatin and somatostatin analogues: diagnostic and therapeutic uses. *Curr. Opin Oncol.* 2002;14:53-7
32. de Herder WW, Kwekkeboom DJ, Valkema R, Feelders RA, van Aken MO, Lamberts Sw, van der Lely AJ, Krenning EP. Neuroendocrine tumors and somatostatin: imaging techniques. *J Endocrinol Invest.* 2005;28(11 Suppl International):132-6
33. de La Chapelle A. Microsatellite instability phenotype of tumors: genotyping or immunohistochemistry? The jury is still out. *J Clin Oncol.* 2002;20(4):897-9
34. Denzler B, Reubi JC. Expression of somatostatin receptors in peritumoral veins of human tumors. *Cancer* 1999;85:188-98
35. Drake IM, Davies MJ, Mapstone NP, Dixon MF, Schorah CJ, White KL, Chalmers DM, Axon AT, Ascorbic acid may protect against human gastric cancer by scavenging mucosal oxygen radicals, *Carcinogenesis.* 1996 Mar;17(3):559-62
36. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* 1990 Aug 11;336(8711):357-9
37. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Ulcerative colitis and colorectal cancer. A population-based study. *N Engl J Med.* 1990 Nov 1;323(18):1228-33
38. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, Stanford JL, Mayne ST, Goedert J, Blot WJ, Fraumeni JF Jr, Chow WH. Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology* 2003;124:1193-1201
39. Enroth H, Kraaz W, Engstrand L, Nyrén O, Rohan T. *Helicobacter pylori* strain types and risk of gastric cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2000;9:981-985
40. Epelbaum J, Dournaud P, Fodor M, Viollet C. The neurobiology of somatostatin. *Crit Rev Neurobiol.* 1994;8(1-2):25-44
41. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990 Jun 1;61(5):759-67
42. Florio T, Morini M, Villa V, Arena S, Corsaro A, Thellung S, Culler MD, Pfeffer U, Noonan DM, Schettini G, Albini A. Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities. *Endocrinology.* 2003 Apr;144(4):1574-84
43. Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Investigation.* 2007 Jan;117(1):60-9
44. Friedenreich C, Norat T, Steindorf K, Boutron-Ruault MC, Pischon T, Mazuir M, Clavel-Chapelon F, Linseisen J, Boeing H, Bergman M, Johnsen NF, Tjønneland A, Overvad K, Mendez M, Quirós JR, Martinez C, Dorronsoro M et al. Physical activity and risk of colon and rectal cancer: the European prospective investigation into cancer and Nutrition. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Dec;15(12):2398-407

45. Friedman D, Rubin PH, Bodian C, Goldstein E, Harpaz N, Present DH. Screening and surveillance colonoscopy in chronic Crohn's colitis. *Gastroenterology*. 2001 Mar;120(4):820-6
46. Gugger M, Waser B, Kappeler A, Schonbrunn A, Reubi JC. Cellular detection of sst2A receptors in human gastrointestinal tissue. *Gut*. 2004 Oct;53(10):1431-6
47. Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A, Reeve AE. E-cadherine germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*. 1998 Mar 26;392(6674):402-5
48. Guillermet-Guibert J, Lahlou J, Pyronnet S, Bousquet C, Susini C. Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Somatostatin receptors as tool for diagnosis and therapy: molecular aspects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005;19(4):535-51
49. Gyde SN, Prior P, Macartney JC, Thompson H, Waterhouse JA, Allan RN. Malignancy in Crohn's disease *Gut*. 1980 Dec;21(12):1024-9
50. Gyde SN, Prior P, Allan RN, Stevens A, Jewell DP, Truelove SC, Lofberg R, Brostrom O, Heller G. Colorectal cancer in ulcerative colitis: a cohort study of primary referrals from three centres. *Gut* 1988 Feb;29(2):20-17
51. Hamilton SR and Aaltonen LA (eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. IARC Press Lyon, 37-52, 2000
52. Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:5783-8
53. Hausler MR, Haussler CA, Bartik L, Whitfield GK, Hsieh JC, Slater S, Jurutka PW. Vitamin D receptor. Molecular signaling and actions of the nutritional ligands in disease prevention. *Nutrition rev*. 2008;66(2):S98-112
54. He Y, Yuan XM, Leu P, Wu S, Xing W, Lan XL, Zhu HF, Hunag T, Wang GB, An R, Zhand YX, Shen GX. The antiproliferative effect of somatostatin receptor subtype 2 in breast cancer cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2009;30(7):1053-9
55. Helboe L, Møller M, Nørregaard L, Schiødt M, Stidsen CE. Development of selective antibodies against the human somatostatin receptor subtypes sst1-sst5. *Braun Res Mol Brain Res*. 1997 Oct 3;49(1-2):82-8
56. Herszenyi L, Miheller P, Tulassay Z. Carcinogenesis in Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis* 2007;25:267-269
57. Hohenberger P, Gretscher S, Gastric cancer, 2003, *Lancet* Jul 26;362(9380):305-15
58. Hou C, Gilbert RL, Barber DL. Subtype-specific signaling mechanisms of somatostatin receptors SSTR1 and SSTR2. *J Biol Chem*. 1994 Apr 8;269(14):10357-62
59. Hoyer D, Bell GI, Berelowitz M, Epelbaum J, Feniuk W, Humphrey PP, O'Carroll AM, Patel YC, Schonbrunn A, Taylor JE, Reisine T. Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1995 Mar;16(3):86-8
60. Hoyer D, Epelbaum J, Feniuk W, Harmar A, Hills R, Humphrey PP, Meyerhof W, O'Carroll AM, Patel YC, Reisine T, Reubi JC, Schindler M, Schonbrunn A, Taylor JE,

- Vezzani A. Somatostatin receptors. IUPHAR Database, International union of basic and clinical pharmacology, 2008
61. Hu C, Yi C, Hao Z, Cao S, Li H, Shao X, Zhang J, Qiao T, Fan D. The Effect of Somatostatin and SSTR3 on Proliferation and Apoptosis of Gastric Cancer Cells. *Cancer Biology & Therapy*. 2004;3:8;726-30
 62. International Agency for Research on Cancer, World Health Organisation, Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.; 1994 Vol 60, Lyon, pp. 177-240
 63. Ito M, Tanaka S, Maeda M, Takamura M, Wada Y, Matsumoto Y, Yoshihara M, Haruma K, Chayama K, Role of gastrin-gastrin receptor system in the expansive growth of human gastric neoplasma. *Digestion* 2008; 78: 163-170
 64. Jakubowska A, Nej K, Huzarski T, Scott RJ, Lubinski J, BRCA2 gene mutations in families with aggregations of breast and stomach cancers. *Br J Cancer* , 2002;87: 888–891
 65. Janson ET, Stridsberg M, Gobal A, Westlin JE, Oberg K. Determination of somatostatin receptor subtype 2 in carcinoid tumours by immunohistochemical investigation with somatostatin receptor subtype 2 antibodies. *Cancer Res*. 1998;85(11):2375-8
 66. Kaupmann K, Bruns C, Hoyer D, Seuwen K, Lübbert H. Distribution and second messenger coupling of four somatostatin receptor subtypes expressed in brauin. *FEBS Lett*. 1993 Sep 27;331(1-2):53-9
 67. Klagge A, Krause K, Schierle K, Steinert F, Dralle H, Fuhrer D. Somatostatin Receptor Subtype Expresion in Human Thyroid Tumours. *Homr Metab Res*. 2010. In print
 68. Kneif S, Hünerbein M; Staging of Gastric and Esophageal Cancers; *Gastroenterologe* 2009; 4(3):202-208
 69. Koenig JA, Edwardsin JM. Endocytosis and recycling of G proetein-couples receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1997;18(8):276-87
 70. Koizumi Y, Tsubono Y, Nakaya N, Kuriyama S, Shibuya S, Matsuoka H, Tsuji I, Cigarette smoking and the risk of gastric cancer: a pooled analysis of two prospective studies in Japan, *Int J Cancer*. 2004 Dec 20;112(6):1049-55
 71. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T, Gastric cancer and Helicobacter pylori. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57(suppl.): 51-65
 72. Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T, Helicobacter pylori infection in gastric cancerogenesis *J Physiol Pharmacol*. 2009 Sep;60(3):3-21
 73. Kosari F, Munz JM, Savci-Heijik CD, Spiro C, Klee EW, Kube DM, Tillmans L, Slazak J, Karnes RJ, Cheville JC, Vasmatis G. Identification of progostic biomarkers of prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(6):1734-43
 74. Kostenich G, Livnah N, Bonasera TA, Yechezkel T, Salitra Y, Litman P, Kimel S, Orenstein A. Targeting small-cell lung cancer with novel fluorescent analogs of somatostatin. *Lung Cancer* 2005; 50:319–28

75. Kostenich G, Oron-Herman M, Kimel S, Livnah N, Tsarfaty I, Orenstein A. Diagnostic targeting of colon cancer using a novel fluorescent somatostatin conjugate in a mouse xenograft model. *Int J Cancer*. 2008 May 1;122(9):2004-9
76. Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2008
77. Kreienkamp HJ, Akgün E, Baumeister H, Meyerhof W, Richter D. Somatostatin receptor subtype 1 modulates basal inhibition of growth hormone release in somatotrophs. *FEBS Lett*. 1999 Dec 3;462(3):464-6
78. Kulaksiz H, Eissele R, Rössler D, Schulz S, Höllt V, Cetin Y, Arnold R. Identification of somatostatin receptor subtypes 1, 2A, 3 und 5 in neuroendocrine tumours with subtype specific antibodies. *Gut*. 2002;50(1):52-60
79. Kumar U, Laird D, Srikanth CB, Escher E, Patel YC. Expression of the five somatostatin receptor (SSTR1-5) subtypes in rat pituitary somatotrophs: quantitative analyses by double-layer immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology*. 1997 Oct;138(10):4473-6
80. Kumar U, Sasi R, Suresh S, Patel A, Thangaraju M, Metrakos P, Patel SC, Patel YC. Subtype-Selective Expression of the Five Somatostatin Receptors (hSSTR1-5) in Human Pancreatic Islet Cells. *Diabetes*. 1999;48:77-85
81. Lahlou H, Guillermet J, Hortala M, Vernejoul F, Pyronnet S, Bousquet C, Susini C. Molecular signaling of somatostatin receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Apr;1014:121-31
82. Lamberts SW, Krenning EP, Reubi JC. The role of somatostatin and its analogs in the diagnosis and treatment of tumors. *Endocr Rev*. 1991 Nov;12(4):450-82
83. Larsson SC, Rafter J, Holmberg L, Bergkvist L, Wolk A. Red meat consumption and risk of cancers of the proximal colon, distal colon and rectum: The Swedish Mammography Cohort. *Int J Cancer*. 2005;113:329-334
84. Larsson SC, Wolk A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer*. 2006 Dec 1;119(11):2657-64
85. Laurén P; The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification; *Acta Pathol Microbiol Scand*, 1965; 64:31-49
86. Laws SA, Gough AC, Evans AA, Bains MA, Primrose JN. Somatostatin receptor subtype mRNA expression in human colorectal cancer and normal colonic mucosae. *Br J Cancer*. 1997;75(3):360-6
87. Le Romancer M, Cherifi Y, Levasseur S, Laigneau JP, Peranzi G, Jais P, Lewin MJ, Reyl-Desmurs F. Messenger RNA expression of somatostatin receptor subtypes in human and rat gastric mucosae. *Life Sci*. 1996;58(13):1091-8
88. Li XJ, Forte M, North RA, Ross CA, Snyder SH. Cloning and expression of a rat somatostatin receptor enriched in brain. *J Biol Chem*. 1992 Oct 25;267(30):21307-12
89. Lin OS. Acquired risk factors for colorectal cancer. *Methods Mol Biol, Cancer Epidemiol*. 2009;472:361-72

90. Lynch HT, Jass J, Lynch JF, Attard T. Hereditary Colorectal Cancer: An updated Review- Part II The Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer). *Gastroenterol & Hepatol*, 2005;1(2):117-33
91. Marshall BJ, Warren JR; Unidentified curved bacilli in the stomach of patient with gastritis and peptic ulceration; *Lancet* 1984 Jun 16; 1(8390):1311-5
92. Mascaro RN, Sherline P. Somatostatin inhibits rapid centrosomal separation and cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Endocrinol*. 1982;111:1394-6
93. Mastrodimou N, Thermos K. The somatostatin receptor (sst1) modulates the release of somatostatin in rat retina. *Neurosci Lett*. 2004 Feb 6;356(1):13-6
94. Miehke S, Hackelsberger A, Meining A, von Armin U, Müller P, Ochsenkühn T, Lehn N, Malfertheiner P, Stolte M, Bayerdörffer E. Histological diagnosis of *Helicobacter pylori* gastritis is predictive of a high risk of gastric carcinoma, *Int J Cancer*. 1997 Dec 10;73(6):837-9
95. Munschen J, Unger N, Schulz S, Höllt V, Schulz S, Steinke R, Lehnert H. Somatostatin receptor subtypes in human pheochromocytomas: Subcellular expression pattern and functional relevance for octreotide scintigraphy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(11):5150-7
96. Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, Overvad K, Olsen A, Tjønneland A, Clavel F, Boutron-Ruault MC, Kesse E, Boeing H, et al. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jun 15;97(12):906-916
97. O'Carroll AM, Raynor K, Lolait SJ, Reisine T. Characterization of cloned human somatostatin receptor SSTR5. *Mol Pharmacol*. 1994 Aug;46(2):291-8
98. Olias G, Viollet C, Küsserow H, Epelbaum J, Meyerhof W. Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem*. 2004 Jun;89(5):1057-91
99. Panetta R, Greenwood MT, Warszynska A, Demchyshyn LL, Day R, Niznik HB, Srikant CB, Patel YC. Molecular cloning, functional characterization, and chromosomal localization of a human somatostatin receptor (somatostatin receptor type 5) with preferential affinity for somatostatin-28. *Mol Pharmacol*. 1994 May;45(3):417-27
100. 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 May;440(5):461-75
101. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P; Global Cancer Statistics 2002, *CA Cancer J Clin* 2005 Mar-Apr; 55(2):74-108
102. Patel SG, Zhou G, Liu SH, Li M, Jeong JW, DeMayo FJ, Gingras MC, Gibbs RA, Fisher WE, Brunicaudi FC. Microarray analysis of somatostatin receptor 5-regulation gene expression in murine pancreas. *World J Surg* 2009 Apr; 33(4):630-7

103. Patel YC, Greenwood MT; Warszynska A, Panetta R, Srikant CB. All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Jan 28;198(2):605-12
104. Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*. 1999 Jul;20(3):157-98
105. Peyrin-Birouet L, Phelip JM, Roblin X. Is ulcerative colitis proctitis associated with an increased risk of colorectal cancer? *Gastroenterology*. 2009 Nov;137(5):1857-8;author reply 1858
106. Qiu CZ, Wang C, Huang ZX, Zhu SZ, Wu YY, Qiu JL. Relationship between somatostatin receptor subtype expression and clinicopathology, Ki-67, Bcl-2 and p53 in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2006 Apr 7;12(13):2011-5
107. Raulf F, Pérez J, Hoyer D, Bruns C. Differential expression of five somatostatin receptor subtypes, SSTR 1-5, in the CNS and peripheral tissue. *Digestion*. 1994;55 Suppl 3:46-53
108. Reubi JC. Somatostatin in the gastrointestinal tract in health and disease. *Yale J Biol Med*. 1992 Sep-Oct;65(5):493-503
109. Reubi JC. Peptide Receptors as Molecular Targets for Cancer in Diagnosis and Therapy. *Endocrine Reviews*. 2003;24(4):389-427
110. Roder D. The Epidemiology of gastric cancer. *Gastric Cancer* 2002; In press.
111. Rohrer L, Raulf F, Bruns C, Buettner R, Hofstaedter F, Schule R. Cloning and characterization of a fourth human somatostatin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 May 1;90(9):4196-200
112. Sakanaka C, Ferby I, Waga I, Bito H, Shimizu T. On the mechanism of cytosolic phospholipase A2 activation in CHO cells carrying somatostatin receptor: wortmannin-sensitive pathway in activated mitogen-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;205:18-23
113. Scharma K, Patel YC, Srikant CB. C-terminal region of human somatostatin receptor 5 is required for induction of RB and G1 cell cycle arrest. *Mol Endocrinol*. 1999 Jan;13(1):82-90
114. Schindler M, Harrington KA, Humphrey PP, Emson PC. Cellular localisation and co-expression of somatostatin receptor messenger RNAs in the human brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1995 Dec 28;34(2):321-6
115. Schindler M, Humphrey PP; Lohrke S, Friauf E. Immunohistochemical localisation of the somatostatin ss2(b) receptor splice variant in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 1999; 90:859-74
116. a) Schulz S, Schreff M, Schmitdt H, Handel M, Przewlocki R, Höllt V. Immunohistochemical localisation of somatostatin receptor sst2A in the rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci*. 1998;10:3700-8
117. b) Schulz S, Schmidt H, Handel M, Schreff M, Höllt V. Differential distribution of alternatively spliced somatostatin receptor isoforms (sst2A and sst2B) in rat spinal cord. *Neurosci Lett*. 1998;257:37-40

118. c) Schulz S, Schulz S, Schmitt J, Wiborny D, Schmidt H, Olbricht S, Weise W, Roessner A, Gramsch C, Höllt V. Immunohistochemical Detection of Somatostatin Receptors sst₁, sst_{2A}, sst_{2B} and sst₃ in Paraffin-embedded Breast Cancer Tissue Using Subtype specific Antibodies. Clin Canc Res. 1998 Sept;4(9):2047-52
119. 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_{2A}. Clin Cancer Res. 2000 May;6(5):1865-74
120. Sharma K, Srikant CB. Induction of wild-type p53, Bax and acidic endonuclease during somatostatin-signaled apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. Int J Cancer. 1998 Apr;76(2):259-66
121. Shimoyama S, Aoki F, Kawahara M, Yahagi N, Motoi T, Kuramoto S, Kaminishi M. Early gastric cancer development in a familial adenomatous polyposis patient. Dig Dis Sci. 2004;49: 260–265
122. Siehler S, Hoyer D. Characterisation of human recombinant somatostatin receptors. Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol. 1999 Nov;360(5):488-532
123. Sjødahl K, Lu Y, Nilsen TI, Ye W, Hveem K, Vatten L, Lagergren J. Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. Int J Cancer. 2007 Jan 1;120(1):128-32
124. Slattery ML, Boucher KM, Caan BJ, Potter JD, Ma KN. Eating patterns and risk of colon cancer. Am J Epidemiol. 1998 Jul 1;148(1):4-16
125. Sobin LH and Wittekind C (eds.): TNM Classification of Malignant Tumours. 6th edition, Wiley-Liss New York, 2002
126. Sobin LH, Gospodarowicz M, Wittekind C (eds.): TNM classification of malignant tumors. 7th Edition, Wiley-Liss New York, 2010
127. Söderlund S, Brandt L, Lapidus A, Karlén P, Broström O, Löfberg R, Ekblom A, Askling J. Decreasing time-trends of colorectal cancer in a large cohort of patients with inflammatory bowel disease. Gastroenterology. 2009 May;136(5):1561-7
128. Srikant CB, Patel, YC. Somatostatin receptors: identification and characterization in rat brain membranes. Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Jun;78(6):3930-4
129. Srikant CB. Cell cycle dependent induction of apoptosis by somatostatin analog SMS-201-995 in AtT-20 mouse pituitary tumor cells. Biochem Biophys Res Commun. 1995;209:400 – 7
130. Stafford ND, Condon LT, Rogers MJ, Helboe L, Crooks DA, Atkin SI. The immunohistochemical localisation of somatostatin receptors 1, 2, 3 and 5 in acoustic neuromas. J Clin Pathol. 2004;57:168–171
131. Stec-Michalska K, Peczek L, Krakowiak A, Michalski B, Chojnacki J, Knopik-Dabrowicz A, Klupinksa G, Nawrot B. Expression of Somatostatin receptor subtype 3 in gastric mucosa of dyspeptic patients in relation to Helicobacter pylori infection and a family history of gastric cancer. J Gastroenterol Hepatol. 2008 Mar; 23(3):424-9

132. Steevens J, Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA, Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of oesophageal and gastric cancer: a prospective cohort study, *Gut*. 2009 Oct 14
133. Stepanyan Z, Kocharyan A, Pyrski M, Hübschle T, Watson AM, Schulz S, Meyerhof W. Leptin-target neurons of the rat hypothalamus express somatostatin receptors. *J Neuroendocrinol*. 2003 Sept;15(9):822-30
134. Takayama T, Koji M, Tsuyoshi H, Sato Y, Niitsu Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol*. 2006; 41:185-192
135. Terry P, Giovannucci E, Michels KB, Bergbist L, Hansen H, Holmberg L. Fruit, vegetables, dietary fiber and the risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93,525-533
136. Tomb JF, White O, Kerlavage AR, Clayton RA, Sutton GG, Fleischmann RD, Ketchum KA, Klenk HP, Gill S, Dougherty BA, Nelson K, Quackenbush J, Zhou L, Kirkness EF, Peterson S, Loftus B, Richardson D, Dodson R, Khalak HG, Glodek A, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*; *Nature*, 1997, Aug 7;388(6642):539-42
137. Trautmann K, Terdiman JP, French AJ, Roydasgupta R, Sein N, Kakar S, Fridlyand J, Snijders AM, Albertson DG, Thibodeau SN, Waldman FM. Chromosomal Instability and Microsatellite-Unstable and Stable Colon Cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Nov 1;12(21):6379-85
138. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper J; *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer, *N Engl J Med*. 2001 Sep 13;345(11):784-9
139. Vanetti M, Kouba M, Wang X, Vogt G, Höllt V. Cloning and expression of a novel mouse somatostatin receptor (SSTR2B). *FEBS Lett*. 1992;311(3):290-4
140. Varecza Z, Elkes K, László T, Perkecz A, Pintér E, Sándor Z, Szolcsány J, Keszrhelyi D et al. Expression of the somatostatin receptor subtype 4 in intact and inflamed pulmonary tissue. *J Histochem Cytochem*. 2009 Dec;57(12):1127-37
141. Vuaroqueaux V, Dutour A, Briard N, Monges G, Grino M, Oliver C, Ouafik L. No loss of sst receptor gene expression in advanced stages of colorectal cancer. *Eur J Endocrinol*. 1999 Apr;140(4):362-6
142. Vuaroqueaux V, Dutour A, Bourhim N, Ouafik L, Monges G, Briard N, Sauze N, Oliver C, Grino M. Increased expression of the mRNA encoding the somatostatin receptor subtype five in human colorectal adenocarcinoma. *J Mol Endocrinol*. 2000 Jun;24(3):397-408
143. Watson P, Lynch HT, Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer*. 1993 Feb;71(3):677-85
144. Weckbecker G, Raulf F, Stolz B, Bruns C. Somatostatin analogs for diagnosis and treatment of cancer. *Pharmacol Ther*. 1993 Nov;60:245-264
145. Winther KV, Jess T, Langholz E, Munkholm P, Binder V. Long-term risk of cancer in ulcerative colitis: a population-based cohort study from Copenhagen County. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004 Dec;2(12):1088-95

146. Xu Y, Song J, Bruno JF, Berelowitz M. Molecular cloning and sequencing of a human somatostatin receptor, hSSTR4. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Jun 15;193(2):648-52
147. Yaghoobi M, Bijarchi R, Narod SA, Family history and the risk of gastric cancer. *Br J Cancer.* 2009 Nov 3
148. a) Yamada Y, Post S, Wang K, Tager HS, Bell GI, Seino S. Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jan 1;89(1):251-5
149. b) Yamada Y, Reisine T, Law SF, Ihara Y, Kubota A, Kagimoto S, Seino M, Seino Y, Bell GI, Seino S. Somatostatin receptors, an expanding gene family: cloning and functional characterization of human SSTR3, a protein coupled to adenylyl cyclase. *Mol Endocrinol.* 1992 Dec;6(12):2136-42
150. c) Yamada Y, Stoffel M, Espinosa R 3rd, Xiang KS, Seino M, Seino S, Le Beau MM, Bell GI. Human somatostatin receptor genes: localization to human chromosomes 14, 17, and 22 and identification of simple tandem repeat polymorphisms. *Genomics.* 1992 Feb;15(2):449-52
151. Yamada Y, Kagimoto S, Kubota A, Yasuda A, Masuda K, Someya Y, Ihara Y, Li Q, Imura H, Seino S, et al. Cloning, functional expression and pharmacological characterisation of a fourth (hSSTR4) and fifth (hSSTR5) human somatostatin receptor subtype. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Sep 15;195(2):844-52
152. Zisman TL, Rubin DT. Colorectal cancer and dysplasia in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2008 May 7;14(17):2662-9

III. Anhang

Tab.IIIa: Patientenkollektiv für die immunhistologische Untersuchung an Tissue Microarrays – Magen

Patient	Alter	Geschlecht	Typ (n.Laurén)	pTNM- Stadium	Grading	UICC-Stadium (2002)
1	79	w	intestinal	3 1 x	2	3A
2	63	m	intestinal	3 1 1	3	4
3	66	m	intestinal	3 0 1	3	4
4	64	m	intestinal	3 2 x	2	3B
5	69	m	intestinal	2a 1 x	1	2
6	72	m	intestinal	3 3 x	2	4
7	66	w	intestinal	2b 1 x	3	2
8	65	m	intestinal	2b 0 x	2	1B
9	61	m	intestinal	3 1 x	3	3A
10	34	w	intestinal	2b 1 x	1	2
11	72	w	intestinal	1 0 x	3	1A
12	67	m	intestinal	4 1 1	3	4
13	71	m	intestinal	2a 1 x	3	2
14	80	m	intestinal	3 1 1	2	4
15	59	m	intestinal	3 3 1	3	4
16	69	m	intestinal	3 3 1	3	4
17	72	m	intestinal	3 2 x	2	3B
18	60	m	intestinal	2a 0 x	2	1B
19	84	m	intestinal	2a 1 x	2	2
20	62	m	intestinal	3 1 x	2	3A
21	70	m	intestinal	1 0 x	1	1A
22	81	w	intestinal	2a 1 x	3	2
23	73	m	intestinal	3 2 x	3	3B
24	72	w	intestinal	2b 0 x	2	1B
25	61	m	intestinal	2b 2 x	2	3A
26	74	m	intestinal	2a 0 x	2	1B
27	51	m	intestinal	2b 0 x	2	1B
28	69	w	intestinal	2b 0 x	2	1B
29	65	m	intestinal	3 1 x	3	3A
30	79	m	intestinal	2a 0 x	2	1B
31	72	m	intestinal	3 1 x	3	3A
32	63	m	intestinal	3 1 x	3	3A
33	65	m	intestinal	3 0 x	3	2
34	63	m	intestinal	3 3 1	3	4
35	77	m	intestinal	2a 1 x	3	2
36	57	m	intestinal	3 0 x	3	2
37	75	m	intestinal	4 3 x	3	4
38	64	m	intestinal	2b 1 x	3	2
39	80	m	intestinal	2a 0 x	3	1B
40	50	m	intestinal	2b 0 x	4	2
41	62	m	intestinal	2b 2 x	3	3A
42	54	m	intestinal	1 0 x	3	1A
43	33	m	intestinal	3 1 x	4	3A
44	78	m	intestinal	3 2 x	3	3B
45	68	m	intestinal	3 1 x	3	3A
46	71	m	intestinal	3 0 x	3	2
47	61	m	intestinal	2b 1 x	3	2
48	73	m	intestinal	1 0 x	2	1A
49	70	w	intestinal	3 0 x	3	2
50	68	m	intestinal	2b 1 1	2	4
51	76	m	intestinal	3 3 x	4	4
52	64	m	intestinal	2b 2 x	3	3A
53	73	m	intestinal	3 2 x	3	3B
54	65	m	intestinal	3 0 x	3	2
55	76	m	intestinal	2b 2 x	3	3A
56	79	m	intestinal	3 0 0	3	2
57	79	m	intestinal	2b 1 x	3	2

Patient	Alter	Geschlecht	Typ (n.Laurén)	pTNM- Stadium	Grading	UICC-Stadium (2002)
58	76	w	intestinal	2b 2 x	3	3A
59	82	w	intestinal	3 0 x	2	2
60	55	w	intestinal	2b 1 x	3	2
61	82	w	intestinal	2a 0 x	2	1B
62	66	m	intestinal	2b 1 1	3	4
63	63	m	intestinal	1 1 x	3	1B
64	81	m	intestinal	2a 0 x	2	1B
65	66	w	intestinal	3 0 x	3	2
66	62	w	intestinal	2a 1 x	2	2
67	70	m	intestinal	2b 0 x	2	1B
68	55	m	intestinal	3 2 x	3	3B
69	77	w	intestinal	3 3 x	3	4
70	71	m	intestinal	2b 2 x	3	3A
71	60	w	intestinal	3 1 x	2	3A
72	62	m	intestinal	3 1 1	3	4
73	61	m	intestinal	2b 0 x	2	1B
74	56	m	intestinal	2a 0 x	2	1B
75	71	w	intestinal	1 0 x	2	1A
76	70	m	intestinal	3 1 1	3	4
77	82	w	intestinal	3 3 1	3	4
78	65	m	intestinal	3 2 1	2	4
79	47	m	intestinal	4 2 1	3	4
80	42	m	intestinal	2b 0 x	2	1B
81	80	w	intestinal	2a 0 x	2	1B
82	73	w	intestinal	2b 1 x	3	2
83	69	m	intestinal	2a 0 x	2	1B
84	76	w	intestinal	2b 1 x	3	2
85	75	m	intestinal	2a 1 x	3	2
86	78	w	intestinal	2b 2 x	3	3A
87	59	m	intestinal	4 1 x	2	4
88	78	w	intestinal	2b 1 x	2	2
89	76	w	intestinal	2b 1 x	3	2
90	64	m	intestinal	3 2 x	2	3B
91	64	m	intestinal	1 0 x	2	1A
92	68	w	intestinal	2b 1 x	3	2
93	45	m	intestinal	1 1 x	3	1B
94	80	w	intestinal	2b 1 x	3	2
95	61	w	intestinal	2b 1 x	2	2
96	55	w	intestinal	2a 0 x	2	1B
97	80	m	intestinal	2b 1 x	2	2
98	60	m	intestinal	3 3 x	3	4
99	84	w	intestinal	2a 0 x	2	1B
100	70	w	intestinal	2a 1 x	2	2
101	40	m	intestinal	2a 0 x	3	2
102	62	w	intestinal	2b 1 x	3	3A
103	74	w	intestinal	3 3 x	2	4
104	62	w	intestinal	2a 0 x	2	1A
105	62	m	intestinal	2a 1 x	2	1A
106	58	w	intestinal	3 1 x	2	3A
107	67	m	intestinal	2b 1 x	3	2
108	77	m	intestinal	2b 1 x	2	2
109	76	m	intestinal	2b 3 x	2	4
110	65	w	intestinal	3 3 x	3	4
111	83	w	intestinal	3 2 1	2	4
112	49	m	intestinal	2b 2 x	2	3A
113	73	m	intestinal	1 0 x	1	1A
114	75	m	intestinal	3 3 x	3	4
115	73	w	intestinal	1 0 x	2	1A
116	68	m	intestinal	2b 1 x	2	2
117	63	m	intestinal	4 1 x	2	4
118	25	m	intestinal	3 1 x	3	3A
119	78	w	diffus	3 x 1	3	4
120	56	m	diffus	3 2 1	3	4

Patient	Alter	Geschlecht	Typ (n.Laurén)	pTNM- Stadium	Grading	UICC-Stadium (2002)
121	37	w	diffus	3 2 1	3	4
122	85	w	diffus	2b 2 x	4	3A
123	69	w	diffus	3 2 1	3	4
124	47	m	diffus	3 x x	3	2
125	69	w	diffus	4 3 x	4	4
126	67	m	diffus	3 1 x	3	3A
127	33	w	diffus	3 1 x	3	3A
128	58	m	diffus	3 0 x	3	2
129	42	w	diffus	3 2 x	4	3B
130	47	m	diffus	3 1 x	3	3A
131	53	m	diffus	4 1 x	3	4
132	62	w	diffus	3 2 x	4	3B
133	58	w	diffus	1 0 x	3	1A
134	50	m	diffus	3 0 x	3	2
135	69	m	diffus	2b 3 x	3	4
136	77	m	diffus	3 3 1	3	4
137	70	m	diffus	2b 1 x	3	2
138	66	w	diffus	3 3 1	3	4
139	74	m	diffus	2b 3 x	3	4
140	64	w	diffus	3 3 x	3	4
141	76	m	diffus	3 1 x	3	3A
142	87	w	diffus	3 3 1	3	4
143	36	w	diffus	2b 0 x	3	1B
144	78	w	diffus	3 2 x	4	3B
145	60	m	diffus	4 1 1	4	4
146	63	m	diffus	4 2 x	3	4
147	69	m	diffus	2b 1 x	3	2
148	58	w	diffus	3 2 1	3	4
149	56	m	diffus	3 2 1	4	4
150	57	w	diffus	3 1 x	3	3A
151	54	w	diffus	2b 0 x	3	1B
152	41	w	diffus	3 0 x	3	2
153	74	m	diffus	2a 0 x	3	1B
154	71	w	diffus	3 1 x	3	3A
155	44	w	diffus	3 3 1	3	4
156	84	w	diffus	2b 0 x	3	1B
157	65	w	diffus	2b 3 x	3	4
158	64	m	diffus	1 0 x	2	1A
159	70	m	diffus	3 3 x	3	4
160	59	m	diffus	2b 1 x	3	2
161	51	m	diffus	2b 1 x	3	2
162	26	w	diffus	4 1 1	3	4
163	74	m	diffus	3 2 x	3	3B
164	61	w	diffus	2b 1 x	3	3A
165	69	m	diffus	2b 1 x	3	2
166	61	w	diffus	3 1 x	3	3A
167	65	w	diffus	3 2 1	3	4
168	80	m	diffus	2a 2 x	3	3A
169	37	m	diffus	1 1 x	3	1B
170	61	m	diffus	2b 1 x	3	2
171	67	w	diffus	2b 2 x	3	3A
172	80	w	diffus	3 2 x	3	3B
173	70	m	diffus	1 0 x	2	1A
174	66	w	diffus	2b 3 x	3	4
175	71	m	diffus	3 3 x	3	4
176	73	w	diffus	2b 0 x	3	1B
177	60	w	diffus	3 2 x	3	3B
178	62	w	diffus	1 0 x	3	1A
179	62	m	diffus	1 1 x	3	1B
180	76	m	diffus	1 1 x	3	1B
181	51	m	diffus	3 2 x	3	3B

Tab.IIIb: Patientenkollektiv für die immunhistologische Untersuchung an Tissue Microarrays – Kolon-Rektum

Patient	Alter	Geschlecht	pTNM-Stadium	Grading	UICC-Stadium (2002)
1	59	m	3 0 0	2	2A
2	83	w	3 0 0	2	2A
3	42	m	3 0 0	2	2A
4	76	w	3 2 0	2	3C
5	83	w	2 0 0	1	1
6	47	m	3 1 0	2	3B
7	60	m	3 1 0	2	3B
8	80	m	3 1 x	2	3B
9	56	m	3 x x	2	2A
10	73	w	4 2 0	2	3C
11	78	w	3 0 x	2	2A
12	63	m	3 2 1	2	4
13	65	w	3 0 0	2	2A
14	65	m	1 0 0	2	1
15	35	w	3 0 0	2	2A
16	54	w	2 1 x	2	3A
17	50	m	3 0 0	2	2A
18	48	m	x 0 0	2	n.b.
19	73	w	3 0 0	2	2A
20	67	w	3 2 0	2	3C
21	68	m	1 0 0	1	1
22	70	m	2 0 0	2	1
23	52	w	3 0 0	2	2A
24	59	w	4 0 x	2	2B
25	69	m	2 1 0	2	3A
26	78	w	3 1 0	2	3B
27	67	w	3 0 0	2	2A
28	67	w	3 0 0	2	2A
29	59	m	2 0 0	2	1
30	79	w	2 0 0	2	1
31	41	w	3 0 x	2	2A
32	63	w	2 0 0	2	1
33	91	m	3 0 x	2	2A
34	85	m	2 x 0	2	1
35	62	m	1 1 0	2	3A
36	69	m	3 0 0	2	2A
37	65	m	3 2 1	2	4
38	87	w	3 1 x	2	3B
39	73	w	3 1 x	2	3B
40	62	w	4 2 x	3	3C
41	80	m	3 2 0	3	4
42	86	m	3 0 x	2	2A
43	58	m	3 1 1	2	4
44	45	m	2 0 0	2	1
45	54	w	2 0 x	2	1
46	71	w	2 0 x	2	1
47	59	m	3 0 x	3	2A
48	74	w	2 0 x	2	1
49	65	m	3 0 x	2	2A
50	48	w	4 x x	2	2B
51	43	m	4 0 x	2	2B
52	62	m	3 0 x	2	2A
53	78	w	3 0 0	2	2A
54	52	w	3 1 0	2	3B
55	62	m	3 0 0	2	2A
56	59	w	3 2 0	2	3C
57	63	w	3 2 1	2	4
58	59	m	3 1 0	2	3B
59	78	m	3 0 x	2	2A
60	56	m	3 1 0	2	3B
61	83	m	3 0 0	2	2A
62	63	m	3 0 x	2	2A

Patient	Alter	Geschlecht	pTNM-Stadium	Grading	UICC-Stadium (2002)
63	60	m	4 1 1	2	4
64	60	m	3 0 0	2	2A
65	70	m	3 0 x	2	2a
66	63	m	4 1 1	2	4
67	81	m	3 2 x	2	3C
68	79	m	3 2 1	3	4
69	70	m	3 2 x	2	3C
70	83	w	3 1 0	2	3B
71	70	m	3 0 x	2	2A
72	78	m	3 2 0	2	34C
73	74	w	4 2 1	2	4
74	59	m	3 2 1	3	4
75	72	m	4 2 1	2	4
76	40	m	3 2 1	3	4
77	65	w	3 0 x	1	2A
78	67	m	2 0 x	2	1
79	59	m	3 2 x	2	3C
80	77	w	3 1 x	2	3B
81	69	m	4 1 x	2	3B
82	64	m	3 0 x	2	2A

IV. Tabellenverzeichnis

Tab.1.1.3.a	TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms (nach UICC, 6. Auflage 2002).....	12
Tab.1.1.3.b	UICC Stadiengruppierung basierend auf die TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms (nach UICC, 6. Auflage 2002).....	13
Tab.1.1.3.c	TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms (nach UICC, 7. Auflage 2010).....	13
Tab.1.1.3.d	UICC Stadiengruppierung basierend auf die TNM-Klassifikation des Magenkarzinoms (nach UICC, 7. Auflage 2010).....	14
Tab.1.2.3.a	TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (Wittekind et al. 2005).....	21
Tab.1.2.3.b	UICC Stadiengruppierung basierend auf die TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (nach UICC, 7. Auflagen 2002).....	22
Tab.1.2.3.c	TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (nach UICC, 7. Auflage 2010).....	22
Tab.1.2.3.d	UICC Stadiengruppierung basierend auf die TNM-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms (nach UICC, 7. Auflage 2010).....	23
Tab.2.1.a	Patientenkollektiv für die immunhistologische Untersuchungen an den Tissue Microarrays – Magen.....	32
Tab.2.1.b	Patientenkollektiv für die immunhistologische Untersuchungen an den Tissue Microarrays – Magen.....	33
Tab.2.1.c	Patientenkollektiv für die immunhistologische Untersuchung an den Tissue Microarrays – Kolon.....	34
Tab.3.1.a	Beispiel für die tabellarische Auswertung – Magen.....	38
Tab.4.1.a	Expression der Somatostatin-Rezeptoren im Magen.....	40
Tab.4.1.b	Expression der Somatostatin-Rezeptoren im Magen.....	40
Tab.4.1.c	Expression der Somatostatin-Rezeptoren im Magen.....	41
Tab. 4.2.a	Expression der Somatostatin-Rezeptoren im Kolon.....	50
Tab.4.2.b	Expression der Somatostatin-Rezeptoren im Kolon.....	50
Tab.IIIa	Patientenkollektiv für die immunhistologische Untersuchung an Tissue Microarrays – Magens.....	81
Tab.IIIb	Patientenkollektiv für die immunhistologische Untersuchung an Tissue Microarrays – Kolon-Rektum.....	84

V. Abbildungsverzeichnis

Abb.1.1.1.	Inzidenz des Magenkarzinoms weltweit.....	6
Abb.1.1.2.	Protektive Faktoren und Risikofaktoren für die Entstehung des Adenokarzinoms des Magens aus normaler Magenmukosa.....	8
Abb.1.2.1.	Indizienz des kolorektalen Karzinoms weltweit.....	15
Abb.4.1.1.	Expressionsmuster von SSTR 1 in tumorfreier Schleimhaut, intestinaler Metaplasie, Magenkarzinom vom diffusen und intestinalen Typ.....	42
Abb.4.1.2.	Expressionsmuster von SSTR 3 in tumorfreier Schleimhaut, intestinaler Metaplasie, Magenkarzinom vom diffusen und intestinalen Typ.....	44
Abb.4.1.3.	Expressionsmuster von SSTR 4 in tumorfreier Schleimhaut, intestinaler Metaplasie, Magenkarzinom vom diffusen und intestinalen Typ.....	45
Abb.4.1.4.	Expressionsmuster von SSTR 5 in tumorfreier Schleimhaut, intestinaler Metaplasie, Magenkarzinom vom diffusen und intestinalen Typ.....	47
Abb.4.2.1.	Expressionsmuster von SSTR 1 in tumorfreier Schleimhaut des Kolons, Kolonkarzinom.....	52
Abb.4.2.2.	Expressionsmuster von SSTR 3 in tumorfreier Schleimhaut des Kolons, Kolonkarzinom.....	53
Abb.4.2.3.	Expressionsmuster von SSTR 4 in tumorfreier Schleimhaut des Kolons, Kolonkarzinom.....	54

VI. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Expression der Somatostatin-Rezeptoren 1, 3, 4 und 5 beim Magen- und Kolonkarzinom

im Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Magdeburg

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 28.06.2010

Franziska Schauer

VII. Lebenslauf

Der **Lebenslauf** wurde aus der elektronischen Version der **Arbeit** entfernt.

Nicht das Beginnen wird belohnt, sondern einzig und allein das Durchhalten.

Katharina von Siena