

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

**Die Bedeutung der Expression der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren
BRS 3, CCKA, CXCR 4, GHRH, GRPR, NK 1, NMBR, NT 2, PAC 1,
VPAC 1 und VPAC 2 bei kolorektalen Tumoren in Abhängigkeit von Tu-
morstadium und Differenzierungsgrad**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

vorgelegt von	Veronika Drwal
aus	Berlin
München	2011

Für Oma und Opa

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Drwal, Veronika:

Die Bedeutung der Expression der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren BRS 3, CCKA, CXCR 4, GHRH, GRPR, NK 1, NMBR, NT 2, PAC 1, VPAC 1 und VPAC 2 bei kolorektalen Tumoren in Abhängigkeit von Tumorstadium und Differenzierungsgrad. -2011. -68 Bl.: 8 Abb., 19 Tab.

Magdeburg, medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität
Dissertation 2011

Kurzreferat:

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von 11 verschiedenen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in kolorektalen Karzinomen untersucht. Alle 11 der untersuchten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren konnten bereits in anderen Tumoren als vermehrt exprimiert nachgewiesen werden. Ein Nachweis in kolorektalen Karzinomen stand noch aus. Die vorliegende Arbeit konnte alle 11 untersuchten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren mittels Immunhistochemie im Kolonkarzinom nachweisen. Zunächst wurde nach unterschiedlicher Expression in Kolonkarzinomen im Vergleich zu gesundem Kolonepithel gesucht. Des Weiteren wurden Unterschiede der Expression in Abhängigkeit von Tumorgröße, Tumordifferenzierung und Metastasenstatus untersucht. Für 3 von 11 Rezeptoren konnte dabei eine signifikante Mehrexpression im Kolonkarzinom gezeigt werden, ein Rezeptor war im Kolonkarzinom im Vergleich zum gesunden Kolonepithel minderexprimiert. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, daß G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Karzinogenese von kolorektalen Karzinomen spielen könnten.

Schlüsselwörter:

Kolonkarzinom

G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Immunhistochemie

I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS	1
II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
III. TABELLENVERZEICHNIS	4
IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1. EINLEITUNG	8
1.1.1 Definition und Epidemiologie	8
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	14
1.2 G-protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR).....	16
1.2.1 Bombesin-ähnliche Rezeptoren	18
1.2.2 Chemokinrezeptoren	19
1.2.3 Tachykininrezeptoren	20
1.2.4 Neurotensinrezeptoren	20
1.2.5 Rezeptoren für VIP und PACAP	21
1.2.6 Weitere G-protein gekoppelte Rezeptoren	22
1.3 GPCR in malignen Erkrankungen	23
1.4 Fragestellung und Hypothese	24
2. MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 Untersuchungskollektiv	26
2.2 Material.....	26
2.2.1 Chemikalien	26
2.2.2 Geräte.....	26
2.2.3 Puffer	27
2.3 Immunhistochemie	27
2.4 Tissue Microarray (TMA)	28
2.5 Auswertung.....	28
2.6 Statistische Methoden.....	29
3. ERGEBNISSE	30
3.1 Charakterisierung des Untersuchungskollektivs.....	31
3.2 Expression von BRS 3	36
3.2.1 Verteilung im Gewebe	36
3.2.2 Grad der Expression.....	36
3.2.3 Statistik	36

3.3	Expression von CCKA	39
3.3.1	Verteilung im Gewebe	39
3.3.2	Grad der Expression.....	39
3.3.3	Statistik	39
3.4	Expression von CXCR 4.....	41
3.4.1	Verteilung im Gewebe	41
3.4.2	Grad der Expression.....	41
3.4.3	Statistik	41
3.5	Expression von GHRH	44
3.5.1	Verteilung im Gewebe	44
3.5.2	Grad der Expression.....	44
3.5.3	Statistik	44
3.6	Expression von GRPR	46
3.6.1	Verteilung im Gewebe	46
3.6.2	Grad der Expression.....	46
3.6.3	Statistik	46
3.7	Expression von NK 1.....	48
3.7.1	Verteilung im Gewebe	48
3.7.2	Grad der Expression.....	48
3.7.3	Statistik	48
3.8	Expression von NMBR.....	50
3.8.1	Verteilung im Gewebe	50
3.8.2	Grad der Expression.....	50
3.8.3	Statistik	50
3.9	Expression von NT 2	53
3.9.1	Verteilung im Gewebe	53
3.9.2	Grad der Expression.....	53
3.9.3	Statistik	53
3.10	Expression von PAC 1	55
3.10.1	Verteilung im Gewebe	55
3.10.2	Grad der Expression.....	55
3.10.3	Statistik	55
3.11	Expression von VPAC 1	57
3.11.1	Verteilung im Gewebe	57

3.11.2 Grad der Expression.....	57
3.11.3 Statistik	57
3.12 Expression von VPAC 2.....	59
3.12.1 Verteilung im Gewebe	59
3.12.2 Grad der Expression.....	59
3.12.3 Statistik	59
4. DISKUSSION	62
4.1 BRS 3, CCKA, CXCR 4, GHRH, GRPR, NK 1, NMBR, NT 2, PAC 1, VPAC 1 und VPAC 2 bei Tumorerkrankungen	62
4.1.1 Bombesin-ähnliche Rezeptoren in malignen Erkrankungen	62
4.1.2 Chemokin-Rezeptoren bei Tumorerkrankungen	66
4.1.3 Tachykininrezeptoren bei Tumorerkrankungen.....	68
4.1.4 Neurotensinrezeptoren bei Tumorerkrankungen	68
4.1.5 Rezeptoren für VIP und PACAP bei Tumorerkrankungen	69
4.1.6 Weitere G-protein gekoppelte Rezeptoren bei Tumorerkrankungen..	71
5. ZUSAMMENFASSUNG	75
V. LITERATURVERZEICHNIS.....	VII
VI. VERSICHERUNG AN EIDES STATT	XXII
VII.DANKSAGUNG.....	XXIII
VIII.CURRICULUM VITAE	XXIV

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: BRS 3, Nichttumor, Vergrößerung x 200	37
Abbildung 2: BRS 3, Tumor, Vergrößerung x 400.....	37
Abbildung 3: CXCR 4, Nichttumor, Vergrößerung x 400.....	42
Abbildung 4: CXCR 4, Tumor, Vergrößerung x 400	42
Abbildung 5: NMBR, Nichttumor, Vergrößerung x 200.....	51
Abbildung 6: NMBR, Tumor, Vergrößerung x 400.....	51
Abbildung 7: VPAC 2, Nichttumor, Vergrößerung x 400	60
Abbildung 8: VPAC 2, Tumor, Vergrößerung x 400.....	60

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: T - Primärtumor	10
Tabelle 2: N - regionäre Lymphknoten.....	10
Tabelle 3: M - Fernmetastasen.....	11
Tabelle 4: Grading	11
Tabelle 5: TNM-Stadiengruppierung, 7. Auflage [UICC 2010,].....	12
Tabelle 6: Häufigkeit und mittlere Immunreaktivität	30
Tabelle 7: Charakteristika des Untersuchungskollektivs.....	32
Tabelle 8: Charakteristika des Patientenkollektivs.....	34
Tabelle 9: Expressionen von BRS 3	38
Tabelle 10: Expressionen von CCKA.....	40
Tabelle 11: Expression von CXCR 4.....	43
Tabelle 12: Expression von GHRH	45
Tabelle 13: Expression von GPRP.....	47
Tabelle 14: Expression von NK 1.....	49
Tabelle 15: Expression von NMBR.....	52
Tabelle 16: Expression von NT 2	54
Tabelle 17: Expression von PAC 1.....	56
Tabelle 18: Expression von VPAC 1.....	58
Tabelle 19: Expression von VPAC 2.....	61

IV. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin Biotin Komplex
AOM	Azoxymethan
APAAP	alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase Methode
BLR	<i>bombesin like receptors</i>
BRS-3	<i>bombesin-receptor subtype 3</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCK	Cholezystokinin
CCKA-R	Cholezystokininrezeptor Subtyp A
CCKB-R	Cholezystokininrezeptor Subtyp B
CXCL12	stromal cell-derived factor-1
DAG	Diacylglycerol
ECL	enterochromaffin-ähnliche Zellen
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
FAP	Familiäre adenomatöse Polypose
FBS	fetales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GH	Wachstumshormon
GHRH	<i>growth hormone-releasing hormone</i>
GHRH-R	<i>growth hormone-releasing hormone receptor</i>
GNRP	<i>guaninnucleotid-releasing-protein</i>
GPCR	G-protein gekoppelte Rezeptoren
GRP	<i>Gastrin-releasing peptide</i>
GRPR	<i>Gastrin-releasing peptide receptor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HNPCC	hereditäres, nicht Polyposis-assoziiertes Kolonkarzinom
HNSCC	Plattenepithelkarzinom der Kopf- und Hals-Region
IP ³	Inositol-1,4,5-Triphosphat
NC-IUPHAR	International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification
LK	Lymphknoten
LOH	Verlust der Heterozygotie
NMB	Neuromedin B

NMBR	Neuromedin B-Rezeptor
NT1	Neurotensinrezeptor Subtyp 1
NT 2	Neurotensinrezeptor Subtyp 2
PAC 1	<i>pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide receptor 1</i>
PACAP	<i>pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide</i>
PAR	Protease-aktivierender Rezeptor
PGE2	Prostaglandin E2
RT-PCR	real-time polymerase-chain-reaction (von manchen Autoren auch für reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion benutzt, ist im Text in diesem Fall ausgeschrieben)
SD	Standardabweichung
TGF-beta1	<i>transforming growth factor beta 1</i>
TMA	Tissue-Microarray
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VIP	Vasoaktives interstinales Peptid
VIP-R	Vasoaktives intestinales Peptid-Rezeptor
VPAC 1	Vasoaktives intestinales Peptid Receptor 1
VPAC 2	Vasoaktives intestinales Peptid Receptor 2

1. Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom umfasst Karzinome des Rektums und des Kolons. Als Unterscheidung gilt hier ein Abstand von 16 cm zwischen aboralem Tumorrand und Anokutanlinie (Herold et al. 2006). Kolorektale Karzinome sind die häufigsten malignen Tumoren des Magen-Darm-Traktes (Roessner et al. 2004), und die zweithäufigsten Karzinome generell, sowohl bei Männern als auch bei Frauen. Die Inzidenz liegt in Deutschland bei über 40/100.000/Jahr. In anderen Ländern liegt sie teilweise deutlich niedriger. Nur etwa ein Zehntel aller kolorektalen Karzinome findet sich bei Patienten unter 50 Jahren. Die Inzidenz verdoppelt sich bei über 40jährigen alle 10 Jahre. Das Karzinomrisiko liegt in der Normalbevölkerung bei 6%. Etwa 75% aller kolorektalen Karzinome gehören in diese Gruppe. Die restlichen 25% entfallen auf Patienten aus Risikogruppen. Dazu gehören Patienten mit kolorektalen Adenomen, Patienten mit Verwandten 1. Grades, die ebenfalls an einem kolorektalen Karzinom erkrankt sind, Patienten mit Colitis ulcerosa oder Patienten mit hereditären Tumorleiden wie der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) oder dem hereditäres, nicht Polyposis-assoziiertes Kolonkarzinom (HNPCC) (Herold et al. 2006).

Pathologisch-anatomisch lassen sich mehrere verschiedene Typen des kolorektalen Karzinoms unterscheiden. Makroskopisch und der Häufigkeit nach absteigend spricht man vom schüsselförmig-exulzerierten Typ, dem polypös-exophytischen Typ und dem seltenen diffus-infiltrierenden Typ. In 90% der Fälle handelt es sich bei kolorektalen Karzinomen um Adenokarzinome, die sich histologisch weiter einteilen lassen. In 70% der Fälle handelt es sich um ein tubuläres, papilläres oder kribriiformes Adenokarzinom. In etwa 20% der Fälle findet man muzinöse Adenokarzinome mit ausgeprägter extrazellulärer Schleimbildung. Als seltenere histologische Varianten sind das Siegelringzellkarzinom, das kleinzellige neuroendokrine Karzinom und das medulläre Karzinom zu nennen (Riede et al.2004)

Die Einteilung der kolorektalen Karzinome erfolgt nach dem System der UICC (Union internationale contre le cancer), welches die Stadien 0 bis IV mit Unter-

gruppen beinhaltet. Die TNM-Klassifizierung der UICC berücksichtigt Tumorgröße, Ausdehnung, Lymphknotenstatus sowie Fernmetastasenstatus. Die Einteilung nach Dukes ist in Deutschland nicht mehr sehr verbreitet. Diese Einteilung kennt die Stadien A bis D, die im Wesentlichen den Stadien I-IV der UICC-Klassifikation gleichen und somit ebenfalls die TNM-Einteilung als Grundlage haben. Der Differenzierungsgrad (Grading) des Tumors wird in gut (G1), mäßig (G2) und gering differenziert (G3) eingeteilt. Low-grade Karzinome sind G1 und G2 Tumoren. High-grade-Karzinome sind G3 Karzinome.

Die Prognose und vor allem auch die Therapie des kolorektalen Karzinoms sind entscheidend abhängig vom Tumorstadium, wobei es therapeutische Unterschiede gibt, je nach dem ob es sich um ein Kolonkarzinom, oder um ein Rektumkarzinom handelt. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt beim Rektumkarzinom im Stadium I noch bei 95%, im Stadium II bei bis zu 85%, im Stadium III bei bis zu 55% und im Stadium IV bei nur noch 5%. Beim Kolonkarzinom sieht es ähnlich aus. Im Stadium I liegt die 5-Jahresüberlebensrate bei bis zu 95%, im Stadium II noch bei bis zu 90%, im Stadium III bei bis zu 65% und im Stadium IV bei bis zu 5%. Die Tumorlokalisation (Kolon vs. Rektum) und das Tumorstadium entscheiden maßgeblich, welcher Therapieansatz gewählt wird (kurativ vs. palliativ; neoadjuvant vs. adjuvant) und welche Operationstechnik zum Einsatz kommt.

TNM-Klassifikation kolorektaler Karzinome, 7. Auflage [UICC 2010]

(Neuerungen im Vergleich zu 6. Auflage von 2002 sind kursiv gedruckt)

Tabelle 1: T - Primärtumor

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
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
T4	Tumor infiltriert direkt in andere Organe oder Strukturen und/oder perforiert das viszerale Peritoneum
<i>T4a</i>	<i>Tumor perforiert das viszerale Peritoneum</i>
<i>T4b</i>	<i>Tumor infiltriert direkt in andere Organe</i>

Tabelle 2: N - regionäre Lymphknoten

NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1–3 regionären Lymphknoten
<i>N1a</i>	<i>1 Lymphknoten befallen</i>
<i>N1b</i>	<i>2-3 Lymphknoten befallen</i>
<i>N1c</i>	<i>Satellitenlymphknotenmetastasen in der Subserosa ohne regionäre Lymphknoten</i>
N2	Metastasen in 4 oder mehr regionären Lymphknoten
<i>N2a</i>	<i>4-6 Lymphknoten befallen</i>
<i>N2b</i>	<i>7 oder mehr Lymphknoten befallen</i>

Tabelle 3: M - Fernmetastasen

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
<i>M1a</i>	<i>ein Organ mit Fernmetastase</i>
<i>M1b</i>	<i>mehr als ein Organ mit Fernmetastase oder Metastasen im Peritoneum</i>

Tabelle 4: Grading

GX	Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden
G1	Gut differenziert
G2	Mäßig differenziert
G3	Schlecht differenziert
G4	Undifferenziert

Tabelle 5: TNM-Stadiengruppierung, 7. Auflage [UICC 2010,]

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1, T2	N0	M0
Stadium II	T3,T4	N0	M0
Stadium IIA	T3	N0	M0
Stadium IIB	T4a	N0	M0
Stadium IIC	T4b	N0	M0
Stadium III	jedes T	N1-2	M0
Stadium IIIA	T1	N2a	M0
Stadium IIIB	T2-T3	N2a	M0 oder:
	T1-T2	N2b	M0
Stadium IIIC	T4a	N2a	M0 oder:
	T3-T4a	N2b	M0 oder:
	T4b	N1-2	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1
Stadium IVA	Jedes T	Jedes N	M1a
Stadium IVB	Jedes T	Jedes N	M1b

In der vorliegenden Arbeit wird noch die 6. Auflage (2002) verwendet, da zum Zeitpunkt der Datenerhebung die neue 7. Auflage noch nicht erschienen war. Die 7. Auflage unterscheidet sich in folgenden Punkten von der 6. Auflage: Die Einteilung der Primärtumoren wurde um zwei Punkte ergänzt, T4a: Tumor perforiert das viszerale Peritoneum, sowie T4b: Tumor infiltriert direkt in andere Organe. Des Weiteren wurde die Einteilung der regionären Lymphknoten um vier Unterpunkte ergänzt. N1 spaltet sich jetzt in N1a (nur ein Lymphknoten befallen) und N1b (2-3 Lymphknoten befallen) auf. N2 wird jetzt in N2a (4-6 Lymphknoten befallen) und N2 b (7 oder mehr Lymphknoten befallen) eingeteilt. Der Fernme-

tastasenstatus wird durch M1a (nur ein Organ mit Fernmetastase) und M1b (mehrere Organe mit Fernmetastase) erweitert. Der Differenzierungsgrad bleibt unverändert.

Aus diesen Erneuerungen ergibt sich die oben gezeigte neue 7. Auflage der UICC-Klassifikation kolorektaler Tumoren.

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die Ätiopathogenese des kolorektalen Karzinoms ist multifaktoriell und schließt u.a. genetische, epigenetische, Ernährungs- und sozio-ökonomische Faktoren ein.

Allen Karzinomen ist gleich, daß ihnen somatische Mutationen zugrunde liegen. Einzelne somatische Mutationen finden sich bereits in Adenomen des Dickdarms. 90% der Epitheldysplasien des Kolons treten in Form von Adenomen auf.

Die Aquisition weiterer Mutationen führt schließlich zum kolorektalen Karzinom im Sinne einer Adenom-Karzinom-Sequenz.

Wichtig in diesem Zusammenhang ist der Verlust der Heterozygotie (*Loss of Heterozygosity*, LOH). Der LOH kommt auf verschiedenen Chromosomen bei verschiedenen Genen vor. Besonders hervorzuheben sind dabei der LOH auf Chromosom 5 im Bereich des *APC*-Gens und der LOH auf Chromosom 17 im Bereich des *P53*-Gens (Jo et al. 2005, de la Chapelle et al. 2004).

Diese genetischen Veränderungen sind in der Regel Neumutationen und werden im Gegensatz zu den hereditären familiären Kolonkarzinomen nicht vererbt. Diese Neumutationen werden durch vorbestehende Risikoerkrankungen wie langjährige entzündliche Darmerkrankungen (z.B. Colitis ulcerosa) oder durch Zustand nach Ureterosigmoidostomie begünstigt.

Das Tumorprogressionsmodell beschreibt wie aus der Kumulation einzelner genetischer Mutationen ein kolorektales Karzinom entstehen kann (Vogelstein et al. 1988). Es kommt zur Aktivierung von Onkogenen wie dem K-RAS-Onkogen und zur Inaktivierung bzw. Verlust von Tumorsuppressorgenen wie dem APC-Tumorsuppressorgen, dem DCC-Tumorsuppressorgen und dem p53-Suppressorgen.

Auch ballaststoffarme, fett- und fleischreiche Nahrung hat Einfluß auf die Karzinogenese des Kolonkarzinoms. So konnten Slattery et al. 2010 nachweisen, daß eine ballaststoffreiche Diät das Risiko einer p53- oder einer K-RAS-Mutation signifikant senken kann (Slattery et al. 2010).

Weitere Risikofaktoren sind vorausgegangene Karzinome der Mamma, des Ovars und des Corpus uteri. Auch eine Darmbilharziose kann einen Risikofaktor darstellen. Alkohol- und Zigarettenkonsum sowie ein Alter über 40 Jahre konnten ebenfalls als Risikofaktoren nachgewiesen werden. Das karzinogene Potential von Alkohol beruht vor allem auf der Toxizität des Metaboliten Acetaldehyd. Außerdem stimuliert Äthanol die Karzinogenese durch Inhibition der DNA-Methylierung (Seitz et al. 2007).

Zu unterscheiden vom sporadischen Kolonkarzinom sind die hereditärer Kolonkarzinome. Zu erwähnen sind vor allem die FAP und das HNPCC. Das HNPCC ist die häufigste Form der vererbten Kolonkarzinomsyndrome. Etwa ein bis sechs Prozent aller malignen Erkrankungen des Kolons entstehen im Rahmen eines HNPCC (Aaltonen et al. 1998). Patienten mit HNPCC haben ein 80%iges Risiko, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Frauen haben zusätzlich dazu auch noch ein 30-50%iges Risiko an einem Karzinom des Endometriums zu erkranken (Strate et al. 2005). Das HNPCC wird autosomal dominant vererbt und ist auf Mutationen in DNA-Reparaturgenen zurück zu führen. Mutationen in fünf Genen wurden inzwischen identifiziert, die zu einem HNPCC führen können. Am häufigsten sind Mutationen in hMSH2 auf Chromosom 2 und hMLH1 auf Chromosom 3. Diese beiden Gene sind bei etwa 15 bis 60 % aller HNPCC-Patienten mutiert. Der Rest verteilt sich auf die Gene hPMS1, hPMS2 und hMSH6 (Syngal et al. 1999). Die Mutationen sind i.d.R. mit einem Verlust der Genexpression verbunden und führen zu einer Mikrosatelliteninstabilität.

Die FAP wird ebenfalls autosomal dominant vererbt und hat eine fast 100%-ige Penetranz. Die genomischen Mutationen finden sich im *APC*-Gen, das auf dem langen Arm von Chromosom 5 liegt. Bis zu einem Drittel der Neuerkrankungen sind allerdings Neumutationen, die von den somatischen Mutationen des *APC*-Gens beim sporadischen, also nichtfamiliären Kolonkarzinom unterschieden werden müssen (Powell et al. 1993). Die Inzidenz der FAP ist aber deutlich geringer als die der HNPCC. Nur etwa 1/10000 Fälle erkranken jedes Jahr neu an FAP. Das sind weniger als 1 % aller Kolonkarzinome (Bülow et al. 1996).

1.2 G-protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)

Man unterscheidet Rezeptoren des menschlichen Körpers nach deren Lokalisierung in der Zelle. Übergruppen sind die membranständigen, die zytoplasmatischen und die nukleären Rezeptoren. Die membranständigen Rezeptoren werden weiter nach deren Aufbau in Rezeptoren mit und Rezeptoren ohne intrinsischer Enzymaktivität, sowie in Ionenkanäle und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) unterteilt (Schartl et al. 2009). Die GPCR bilden die größte Rezeptorgruppe. Sie wurden in den siebziger Jahren von der Arbeitsgruppe Rodbell/Welton entdeckt (Welton et al. 1977).

GPCR sind Membranrezeptoren und gehören zur Familie der heptahelicalen Rezeptoren (auch Sieben-Transmembranäre-Rezeptoren oder Serpentinrezeptoren). Sie sind für die Weiterleitung hormoneller Reize, der Information von Geschmacks- und Geruchsstoffen und sogar von Lichtquanten wichtig. Sie sind gekennzeichnet durch sieben Transmembrandomänen mit dem N-Terminus an der extrazellulären und dem C-Terminus an der intrazellulären Seite. Sie bestehen aus etwa 400-500 Aminosäuren und haben eine Molekularmasse von 60-80 kDa. Allen GPCR ist gemeinsam, daß an der Signaltransduktion ein heterotrimeres G-Protein beteiligt ist. G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten. Diese sind die intrazellulär gelegene α -Einheit, an der entweder Guanosindiphosphat (GDP) oder Guanosintriphosphat (GTP) binden, und die transmembranär gelegene β - und γ -Einheit. In aktiver Form ist GTP gebunden, in inaktiver GDP. Zur Überführung der inaktiven in die aktive Form ist häufig ein zusätzliches Guaninnucleotid-releasing-protein (GNRP) nötig.

Die Signaltransduktion läuft folgendermaßen ab. Der Rezeptor wird durch einen für ihn spezifischen Liganden aktiviert. Dies kann entweder extrazellulär, transmembranär oder intrazellulär geschehen. GDP dissoziiert daraufhin vom Komplex aus aktiviertem Rezeptor und G-Protein ab, GTP kann jetzt gebunden werden. Wenn dies geschehen ist löst sich die nun aktivierte und mit GTP beladene α -Einheit vom restlichen β - γ -Komplex. Diese kann nun, je nach Art des G-Proteins, entweder Enzyme aktivieren oder inaktivieren. Ein solches Enzym ist zum Beispiel die Adenylatzyklase. Sie stellt aus ATP den Second Messenger

cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) her. cAMP kann z. B. die Proteinkinase A aktivieren, oder direkt die Genexpression beeinflussen. Ein zweites Enzym, welches durch die α -Einheit aktiviert werden kann, ist die Phospholipase C. Wird diese aktiviert, spaltet sie ein Membranlipid in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP³). IP³ führt zur Ausschüttung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern, DAG aktiviert mit Kalziumionen die Proteinkinase C (Ganten et al. 2003). Am Ende der Kaskade stehen wachstumstimulierende Prozesse, die unter anderem bei der Aufrechterhaltung der Proliferation maligner Zellen des Kolons, des Pankreas und der Lunge eine Rolle spielen (Rozenfurt et al. 2002).

Danach kommt es zur Spaltung von GTP zu GDP und damit zur Inaktivierung der α -Einheit. Sie bindet wieder an den β - γ -Komplex und kann dann so erneut aktiviert werden (Luttrell et al. 2006).

Trotz dieser Gemeinsamkeiten bilden die GPCR eine sehr heterogene Familie. Die über 2000 bisher entdeckten verschiedenen GPCR lassen sich in fünf Unterfamilien einteilen. Man unterscheidet dabei laut NC-IUPHAR (International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification) die folgenden Klassen. Die Rhodopsin-ähnlichen, die Sekretin-Rezeptorfamilie und die metabotropen Glutamatrezeptoren. Die Klasse der so genannten Pheromonrezeptoren und als letzte Klasse lässt sich noch die Familie der „frizzled“ und „smoothed“ GPCR, also die „gekräuselten“ und „geglätteten“ GPCR erwähnen (Bockaert et al. 1999). Diese Unterfamilien haben eine gemeinsame Ligandenstruktur, eine annähernd homologe Aminosäuresequenz oder ähnliche Rezeptorfunktionen (Ji et al. 1998).

Die Funktionen der GPCR sind dementsprechend vielfältig. Unter anderem von besonderer Bedeutung sind, die auch in dieser Arbeit beobachteten Rezeptoren der Neuropeptide wie Gastrin, Cholecystokinin (CCK) und die Bombesin-ähnlichen Rezeptoren. Es ist bewiesen, daß diese Peptide als Neurotransmitter, parakrine Regulatoren oder als systemische Hormone wirken. In diesem Zusammenhang konnte nachgewiesen werden, daß eben diese Peptide als Wachstumsfaktoren in Zellkulturen fungieren. Diese Tatsache legt den Verdacht nahe, daß die Agonisten der GPCR über deren Signalkaskade direkt die Zellproliferation regulieren können (Rozenfurt et al. 1986).

1.2.1 Bombesin-ähnliche Rezeptoren

GRPR (*gastrin-releasing peptide* Rezeptor), BRS 3 (bombesin receptor Subtyp 3) und NMBR (Neuromedin B Rezeptor) gehören zur Familie der Bombesin-ähnlichen Rezeptoren (BLR). Diese Rezeptoren sind verwandt mit Bombesin, einem Peptid, das 1971 erstmals aus der Rotbauchunke (*Bombina bombina*) isoliert wurde (Anastasi et al. 1971).

Bombesin findet sich aber auch in Säugetieren und bewirkt dort verschiedene physiologische Effekte. So wurden beispielsweise Wirkungen auf Kontraktionen des Uterus, des Kolons und des Ileums beobachtet. Des Weiteren stimuliert es die Gastrin- und Insulinsekretion (Esparmer et al. 1970).

Gastrin-releasing peptide (GRP) und Neuromedin B (NMB) sind die Liganden von GRPR und NMBR und sind Bombesin-ähnliche Peptide. GRP hat die Aminosäuresequenz His-Leu-Met an seinem C-terminalen Ende und zeigt große Übereinstimmung mit Bombesin. Dies gilt auch für NMB mit einer Aminosäuresequenz His-Phe-Met am C-terminalen Ende. Für NMB konnte nachgewiesen werden, daß es die glatte Muskulatur von Ratten stimuliert (Minamoto et al. 1983).

Die drei Rezeptoren GRPR, BRS 3 und NMBR haben zu einem großen Teil sogar eine identische Aminosäuresequenz. BRS 3 und NMBR zu 47%, BRS 3 und GRPR sogar zu 51% (Fathi et al. 1992).

Der GRPR findet sich unter anderem in gesundem menschlichem Pankreas- sowie Magengewebe und des weiteren, allerdings weniger stark exprimiert, in der Nebennierenrinde und im menschlichen Gehirn, wo sein Ligand verschiedene gastrointestinale bzw. zentralnervöse Aufgaben übernimmt.

NMBR, bzw. dessen Liganden scheinen eine physiologische Rolle in der Regulation der Hypophysen-Nebennierenrindendachse sowie bei der Thyreotropin-ausschüttung zu spielen (Malendowicz et al. 1996, Rettori et al. 1989).

BRS 3 ist ein so genannter „orphan receptor“, für den bis jetzt der Ligand noch nicht gefunden wurde. Da er aber knapp 50 % seiner Aminosäuresequenz mit NMBR und GRPR teilt, gehört er ebenfalls zu Gruppe der BLR. Obwohl der Ligand für BRS-3 noch unbekannt ist, scheint es klar zu sein, daß BRS-3 eine wichtige Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel spielt. Mäuse ohne BRS-3 entwickelten Adipositas, Diabetes und arterielle Hypertonie (Ryan et al. 1998).

2005 konnten Porcher et al. mittels reverser Transkriptase-PCR und anschließender quantitativer real-time-PCR BRS-3 in der Tunica muscularis des Gastrointestinaltraktes von Ratten nachweisen. Zusätzlich wurde noch eine Immunhistochemie durchgeführt, um die Lokalisation in der Zelle zu untersuchen. BRS-3 wurde vor allem in den Neuronen der myenterischen sowie submukösen Ganglien gefunden, und dort vor allem entlang der Zellmembran. Außerdem konnte BRS-3 im Zytosol der Cajalzellen des Auerbachplexus nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, daß BRS-3 auch an der Motilität des Darmes beteiligt sein könnte (Porcher et al. 2005).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß BRS 3 bei Asthmatikern Bronchialepithel dazu bringen kann *transforming growth factor beta 1* (TGF-beta1) zu produzieren und so direkt Fibroblasten zu aktivieren. Normalerweise würde das Bronchialepithel über Prostaglandin E2 (PGE2) genau das Gegenteil bewirken, nämlich eine Hemmung der Fibroblasten. Bei Patienten mit Asthma kann BRS-3 also als direkter Wachstumsfaktor für Fibroblasten fungieren (Wang et al. 2007).

1.2.2 Chemokinrezeptoren

CXCR 4 gehört zur Gruppe der Chemokinrezeptoren, Rezeptoren der chemotaktisch wirksamen Zytokine. Chemokine sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 8-10 kDa und spielen insbesondere im Immunsystem eine Rolle, wobei sie vor allem auf Neutrophile, Monozyten, Lymphozyten und Eosinophile wirken. Chemokine können die Zellbewegungen während einer Entzündungsreaktion koordinieren und sind wichtig für die Migration von hämatopoetischen Stammzellen. Den Chemokinen ist gemeinsam, daß sie über Cysteinreste verfügen, die über Disulfidbrücken verbunden sind (Zlotnik et al. 2000).

Bis heute sind mehr als 50 Chemokine entdeckt worden, die sich in vier Klassen einteilen lassen: CXC, CC, C und CX3C. Die dazugehörigen GPCR werden nach ihren Liganden eingeteilt, also CXCR 1-5, CCR 1-11, XCR1 und CX3CR1 (Balkwill 2004). Der Ligand für CXCR 4 ist CXCL12 (*stromal cell-derived factor-1*).

1.2.3 Tachykininrezeptoren

Neurokinin1 (NK 1) gehört zur Gruppe der Tachykinine. Es wurden bis heute drei verschiedene Rezeptoren entdeckt: NK 1, NK 2 und NK3. Der Ligand von NK 1 ist Substanz P, ein Neuropeptid, das in der Schmerzverarbeitung und Weiterleitung eine große Rolle spielt (Maggi et al. 1995).

Weitere Liganden an Tachykininrezeptoren sind Neurokinin A und Neurokinin B. Diese werden zum Beispiel von den cholinergen Motoneuronen des Darmes synthetisiert, und wirken dort als exzitatorische Transmitter auf die longitudinale und zirkuläre Muskulatur (Maggi et al. 1997).

NK 1 und NK 2 kommen im glatten Muskelgewebe des gesamten Intestinums vor.

An Zellen der glatten Muskulatur des Ösophagus konnte nachgewiesen werden, wie Tachykininrezeptoren direkt an der Kontraktion der Speiseröhre beteiligt sind. Die Kontraktion wird dabei durch eine Kombination von Kalziumeinströmen aus intrazellulären Speichern und Einstrom durch L-Typ Kalziumkanäle verursacht.

Ein nichtselektiver Kationeneinstrom verursacht durch Neurokinin A läßt die Membrandepolarisierung entstehen, während die L-Typ Kalziumkanäle direkt zu einer Erhöhung der Kalziumkonzentration in der Muskelzelle und somit zur Kontraktion führen (Kovac et al. 2006).

Tachykinine sind des Weiteren wichtig im zentralen, sowie im peripheren Nervensystem. Sie sind zum Beispiel verantwortlich für die neurogene Entzündung bei verschiedenen Prozessen wie Migräne oder Arthritiden (Pattacchini et al. 1995).

1.2.4 Neurotensinrezeptoren

Der Neurotensinrezeptor Subtyp 2 (NT 2) gehört zu den Neurotensinrezeptoren. Diese beinhalten drei Rezeptoren, von denen allerdings nur zwei zur Familie der GPCR gehören. Der Ligand Neurotensin ist ein Peptid, das vor allem im Gehirn und im Gastrointestinaltrakt gefunden wird (Vincent et al. 1999). Es stimuliert die Proliferation im Pankreas, Dünndarm und in der Kolonmukosa, sowie die Sekretion im Pankreas, außerdem inhibiert es die Dünndarmmotilität (Evers et al.

1992, Dong et al. 2000). Des Weiteren wurde nachgewiesen, daß Neurotensin unter anderem auch an der Dopaminübertragung und an analgetischen Prozessen beteiligt ist und außerdem eine zerebrale Hypothermie bei Herzstillstand induzieren kann (Myers et al. 2009). Unter anderem wird angenommen, daß Neurotensin als endogenes Neuroleptikum fungiert. So konnte an Mäusen gezeigt werden, daß ein Neurotensindefizit zu verminderter Präpulsinhibition führt (Kinkead et al. 2005). Die Präpulsinhibition ist eine Art „Vorwarnung“ an das Gehirn, damit ein Reiz nicht völlig unvorbereitet eintrifft. Bei Erkrankungen wie zum Beispiel Schizophrenie ist diese Funktion ebenfalls vermindert. Außerdem konnte für verschiedene Antipsychotika nachgewiesen werden, daß sie im Striatum zu einer Neurotensinausschüttung führen, was ebenfalls für eine antipsychotische Wirkung von Neurotensin sprechen könnte (Dobner et al. 2001).

1.2.5 Rezeptoren für VIP und PACAP

Das Neuropeptid vasoaktives intestinales Peptid (VIP) fördert die Salzsäureproduktion im Magen, des Weiteren ist es auch für Vasodilatationen in Gefäßen und Bronchien zuständig.

Das *pituitary adenyl cyclase-activating polypeptide* (PACAP) stimuliert über den *pituitary adenyl cyclase-activating polypeptide* Rezeptor 1 (PAC 1) die enterochromaffin-ähnlichen Zellen (ECL) im Magen, die für die Histaminausschüttung verantwortlich sind (Zeng et al. 1999). VIP und PACAP ist gemeinsam, daß sie an die gleichen Rezeptoren binden, nämlich an den vasoaktives intestinales Peptid-Rezeptor 1 (VPAC 1) und an den vasoaktives intestinales Peptid-Rezeptor 2 (VPAC 2). PACAP bindet zusätzlich noch an PAC 1 (Laburthe et al. 2002). Des Weiteren haben PACAP und VIP eine Sequenzhomologie von 68% (Vertongen et al. 1997). VPAC 1 wurde in diversen Geweben gefunden, dazu gehören auch Lunge, Leber Dünndarm, Niere und das Gehirn (Ishihara et al. 1992). VPAC 2 wird vor allem in Blutgefäßen und Geweben mit glatter Muskulatur exprimiert, wo das VIP jeweils eine Erschlaffung des jeweiligen Gewebes bewirkt. Organe in denen VPAC 2 nachgewiesen werden konnte sind Pankreas, Niere, Herz, Magen und Hoden. Zusätzlich findet sich VPAC 2 auch im zentralen Nervensystem, insbesondere im suprachiasmatischen Nucleus (Usdin et al. 1994, Sheward et al. 1998).

PAC 1 hingegen findet sich typischerweise im Nebennierenmark und im Gehirn (Reubi 2000).

1.2.6 Weitere G-protein gekoppelte Rezeptoren

Der Cholezystokininrezeptor Subtyp A (CCKA-R) gehört ebenso wie sein naher Verwandter, der Cholezystokininrezeptor Subtyp B (CCKB-R), zu den GPCR. Beide Rezeptoren haben sowohl Gastrin als auch CCK als Liganden. CCK und Gastrin wirken an verschiedenen Stellen im Gastrointestinaltrakt, insbesondere sind sie beteiligt an der Magensäurebildung, der Magenentleerung sowie an der Gallenblasenmotilität (Noble et al. 1999).

Die Unterscheidung der CCK-Rezeptoren in den A und B-Subtyp erfolgte nach ihrer Bindungsaffinität zu CCK. CCKA-R besitzt eine tausendfach höhere Affinität zu CCK als zu Gastrin. Die Affinität von CCKB ist für Gastrin und CCK etwa gleich hoch. (Kennedy et al. 1995).

CCKA-R findet sich im gesamten Gastrointestinaltrakt, insbesondere im Bereich des Pankreas, und auch in bestimmten Hirnregionen. Im Pankreas bewirkt es die Sekretion der pankreatischen Enzyme, sowie das Pankreaswachstum.

CCKB-R wird vor allem im Magen und im Gehirn gefunden. Dort ist er unter anderem für die Regulation von Hunger und Sättigung zuständig (Morisset et al. 2000).

Rettenbacher et al. (2001) zeigten mittels Autoradiographie, daß CCKA-R verstärkt auch im Plexus myentericus des Gastrointestinaltraktes vorkommt, und so auch an der Steuerung der Darmmotilität beteiligt ist.

Eine weitere Bedeutung, kommt CCKA-R bei der Schizophrenie zu. Tachikawa et al. (2001) konnten zwei Polymorphismen in der Promotorregion des CCKA-R-Gens nachweisen, die offensichtlich eine Prädisposition für Schizophrenie darstellen.

GHRH-R ist der Rezeptor für das Neuropeptid Wachstumshormon-releasing Hormon, daß aus dem Nucleus arcuatus im Hypothalamus sezerniert wird und die Ausschüttung von Wachstumshormon (GH) aus der Hypophyse steuert. GHRH ist aber auch an vielen extrahypothalamischen Prozessen beteiligt. So wird von Mayo et al. (1996) auch die Produktion von GHRH in der Placenta beschrieben.

Insbesondere die ektope GHRH-Produktion steht im Verdacht, an der Karzinogenese verschiedener Tumoren beteiligt zu sein (Kiaris et al. 2005).

Auch im zirkadianen Rhythmus scheint GHRH eine große Rolle zu spielen. Sowohl an Tieren als auch an Menschen konnte gezeigt werden, daß eine GHRH Gabe am Anfang der Ruheperiode zu einer Tiefschlafvermehrung führt (Ehlers et al. 1986, Kerhofs et al. 1993).

1.3 GPCR in malignen Erkrankungen

Viele GPCR spielen neben ihren mannigfaltigen Wirkungen im gesunden Gewebe auch bei der Tumorgenese eine Rolle. Ursprünglich nahm man an, daß GPCR sich vor allem in postmitotischen Zellen befinden. Doch inzwischen weiß man, daß GPCR sehr wohl auch in proliferierenden Zellen exprimiert werden. Sie sind beteiligt an der Embryogenese, am Umbau von Geweben, an Entzündungsprozessen, an der Angiogenese, am Wachstum normaler Zellen, aber auch am Wachstum von malignen Zellen.

Werden GPCR überexprimiert, so können sie über ihre Liganden mitwirken an Tumorzellwachstum, Tumorangiogenese und Metastasenbildung. Neuerdings weiß man, daß maligne Zellen sich die physiologischen Eigenschaften von GPCR zu eigen machen und so nicht nur zu abnormal ausgeprägtem Zellwachstum, sondern auch zum Beispiel zur Ausschaltung von Immunerkennungsmechanismen, oder zur Erhöhung des Sauerstoff- und Nahrungsangebots führen können (Dorsam et al. 2007).

Zu diesen GPCR gehören unter anderem die Gruppen der Protease-aktivierenden Rezeptoren (PAR), Chemokin-rezeptoren und Rezeptoren für bioaktive Lipide. So ist Thrombin beispielsweise in der Lage, den N-Terminus von PAR 1 und PAR 4 abzuspalten, so daß der N-Terminus jetzt als Ligand für den GPCR wirken kann und ihn aktiviert. Dadurch werden Proteasen in der direkten Umgebung des Tumors aktiviert (Coughlin 2000). Thrombin aktiviert so über den GPCR direkt das Entstehen, das Wachsen und die Neugestaltung endothelialer Zellen. Indirekt wirken GPCR auch über die Aktivierung des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) an der Angiogenese von Tumoren mit (Richard et al. 2001).

PAR 1 kommt sowohl im Mamma-Karzinom als auch in Plattenepithelkarzinomen des Kopf und Halses (HNSCC) vor (Even-Ram 1998, Liu et al. 2001).

Die Chemokine der CXC-Familie sind zudem in der Lage, über GPCR entweder fördernd oder hemmend auf die Angiogenese in malignen Tumoren zu wirken, je nach dem was für einen N-Terminus sie besitzen. Die hemmend wirkenden Chemokine können so über die Drosselung der Angiogenese das Tumorwachstum sowie die Metastasenbildung verlangsamen (Strieter et al. 2006, Arenberg et al. 1996).

Viele verschiedene GPCR konnten in einer Vielzahl maligner Tumoren nachgewiesen werden. Nur beispielhaft sollen hierfür die Studien von Reubi et al. (1997) erwähnt werden, die zeigen, daß CCK-B deutlich vermehrt in medullären Schilddrüsenkarzinomen, Astrozytomen und kleinzelligen Bronchialkarzinomen vorkommt. Nicht ganz so häufig konnte CCK-B in malignen Tumoren der Brust, des Endometriums, der Bauchspeicheldrüse und in Adenokarzinomen des Ovars nachgewiesen werden. Gar keine, oder nur eine geringe Expression fand sich im Kolonkarzinom, in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen sowie in den nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen (Reubi et al. 1997).

1.4 Fragestellung und Hypothese

Die Untersuchung auf eine Mehrexpression von GPCR im kolorektalen Karzinom ist aus mehreren Gründen von großer Bedeutung. Zum einen geht es um die Frage des prognostischen Wertes. Inwieweit lässt sich anhand des Rezeptorstatus, ähnlich wie z.B. von Tumorgröße der Metastasenstatus, eine Prognose für den Krankheitsverlauf ableiten. Ebenfalls von großer Bedeutung könnte der diagnostische Nutzen sein. Bei signifikanter Mehrexpression im Tumor wäre eine Nutzung für die Szintigraphie denkbar. So werden beispielsweise Gastro-enteropankreatische neuroendokrine Tumoren mittels Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie (Octreotid-Scan) nachgewiesen. Eine ähnliche Untersuchung wäre auch für die im kolorektalen Karzinom exprimierten GPCR denkbar. Von ebenfalls großem Stellenwert ist der denkbare therapeutische Nutzen. GPCR sind die häufigsten Therapieangriffspunkte in der modernen Medizin. Die verschiedenen Funktionen der Liganden der GPCR, wie z.B. die Angiogenese in malignen Tumoren bieten einen idealen Angriffspunkt für therapeutische Zwecke. GPCR sind ausgezeichnete Ziele für z.B. die Dauertherapie zur Prävention eines Tumorrezidivs. Auch eine Nutzung für die Primärtherapie ist denkbar.

Alle in dieser Arbeit untersuchten GPCR konnten bereits in anderen malignen Tumoren, nachgewiesen werden. Ob eine Mehrexpression auch im kolorektalen Karzinom vorliegt, konnte bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese aufgestellt, daß die oben genannten GPCR in Kolonkarzinomen signifikant mehr- oder minderexprimiert werden und deren Expression mit dem Tumorstadium und/oder Differenzierungsgrad korrelieren. Daraus ergibt sich die folgende Fragestellung: Sind die G-Proteingekoppelten-Rezeptoren BRS 3, CCKA, CXCR 4, GHRH, GRPR, NK 1, NMBR, NT 2, PAC 1, VPAC 1 und VPAC 2 bei kolorektalen Karzinomen signifikant hoch- oder herunterreguliert, und besteht ein Zusammenhang zwischen Expression der GPCR und Tumorstadium bzw. Differenzierungsgrad?

Wäre dies der Fall, könnten die Ergebnisse langfristig von großem Wert sowohl für die Diagnostik, als auch für die Therapie sein.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungskollektiv

Aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg wurden 83 Fälle mit kolorektalem Karzinom herausgesucht. Alle 83 Patienten sind zwischen 1996 und 1998 in der Klinik für Allgemein Chirurgie der Otto-von-Guericke-Universität operiert worden. Alle Proben aus dem Tumorge-webe und der nicht-neoplastischen Kolonschleimhaut waren in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden. Die histologische Klassifikation der kolorek-talen Karzinome erfolgte an Hämatoxylin- und Eosin-gefärbten Pa- raffinschnittpräparaten. Alle Karzinome wurden nach der 6. Auflage der pTNM- Klassifikation (UICC) klassifiziert. Der Differenzierungsgrad wurde in G1: (stark differenziert) bis G3 (wenig differenziert) unterteilt.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Trinatriumcitratdihydrat, Citronensäure-Monohydrat und Tris-HCl wurden bei der Firma Merck (Darmstadt) bezogen, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan bei der Firma Fluka Chemie GmbH (Buchs SG, Schweiz) und Ethylendiamintetraessig- säure (EDTA) bei der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen). Das fetale Kälberserum (FBS) und das RPMI-Medium wurden bei Invitrogen GmbH, Karlsruhe bezogen. Der Brückenantikörper polyvalentes anti-Maus Immunglobu- lin G wurde bei der Firma Immunotech (Marseilles, Frankreich) eingekauft, der *Avidin Biotin Komplex (ABC)* stammte von Vector Laboratories (Alexis Deutsch- land GmbH, Grünberg) und das Chromogen Fast Red von der Firma Immunotech (Marseille, Frankreich).

2.2.2 Geräte

Die folgenden Geräte wurden verwendet: Mikroskop Vanox AHBT 3 von Olym- pus Optical co. LTD. Japan, das Mikrotom HM 335 E (MICROM GmbH, Wall- dorf), der Kryostat Mod.2700 Frigocut REICHERTJUNG, der Nexes Immun- färbeautomat (Ventana Medical Systems GmbH, Illkirch, Frankreich) und für die

Herstellung von *Tissue Microarrays* (TMA) der MTA Booster Tissue Arrayer (Alpha Matrix Biotech GmbH, Rödermark, Deutschland).

2.2.3 Puffer

Citrat-Puffer wurde wie folgt hergestellt: Die erste Lösung bestand aus 29,4 g Trinatriumcitratdihydrat in 1 l dH₂O. Die zweite Lösung aus 2,4 g Citronensäure-Monohydrat in 200 ml dH₂O. 75 ml der ersten und 25 ml der zweiten Lösung in 900 ml dH₂O ergaben dann die fertige Gebrauchslösung.

Für den EDTA-Puffer wurden 29,22 g EDTA-Substrat in 1 l dH₂O gelöst, mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt und anschließend mit dH₂O im Verhältnis 1:100 auf die Gebrauchsverdünnung eingestellt

Die RPMI-Lösung bestand aus 5 ml RPMI-Medium, 5 ml FBS, 45 ml dH₂O und 100 µg Natriumazid mit einem pH-Wert von 7,4-7,6.

Die Tris-Puffer Stammlösung bestand aus 9 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 68,5 g Tris-HCl, 87,8 g NaCl auf 1 l dH₂O. Die Tris-Puffer-Gebrauchslösung wurde aus der Stammlösung durch 1:1 Verdünnung mit dH₂O hergestellt.

2.3 Immunhistochemie

Bei den verwendeten Antikörpern handelt es sich durchgehend um nicht kommerzielle Antikörper. Die Immunisierungen wurden bei der Firma Gramsch Laboratories in Schwabhausen durchgeführt. Die Spezifität wurde von Herrn Prof. Dr. Schulz, Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena, durchgehend überprüft und sichergestellt. (Schulz et al 2004, 2005, 2006a, 2006b, 2006c, 2006d, 2006e, Fischer et al. 2008)

Für die immunhistologischen Färbungen wurden 3 µm dicke Paraffinschnittpräparate auf Superfrost-Ultra-Plus-Objektträger aufgezogen und bei 60°C im Brutschrank getrocknet. Nach der Entparaffinierung in Xylol wurden die Schnitte in einer absteigenden Äthanolreihe (100%, 96%, 75%) rehydriert und mit Tris-Puffer gespült. Die Antigendemaskierung erfolgte mit Citrat-Puffer in der Mikrowelle für 3 mal 10 Minuten bei 600 Watt. Danach wurden die Schnitte abgekühlt und mit Tris-Puffer gespült. Anschließend wurden die Primärantikörper in folgenden Verdünnungen mit RPMI aufgetragen: CCKA 1:10, CXCR 4 1:5, GHRH 1:50, GRPR 1:20, NK 1 1:20, NMBR 1:10, NT 2 1:10, PAC 1 1:50, VPAC 1

1:150 und VPAC 2 1:20. Die Primärantikörper inkubierten für eine Stunde bei 37 °C. Überschüssiger Antikörper wurde mit Tris-Puffer ab gespült (3 x 5 min.) und anschließend erfolgte die Inkubation mit dem polyvalentem anti-Maus/anti-Kaninchen Immunglobulin G-Brückenantikörper. Es erfolgte eine erneute Spülung mit Tris-Puffer. Anschließend wurde mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Streptavidin aufgetragen und 30 Min. in der feuchten Kammer unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach erfolgte eine fünfzehnminütige Inkubation mit Fast Red in der feuchten Kammer. Zum Schluss folgte die Gegenfärbung mit Hämalaun, zum Sichtbar machen der Zellkerne sowie Eindeckung mit Gelantine.

2.4 Tissue Microarray (TMA)

Bei diesem Verfahren werden aus vielen verschiedenen Paraffinblöcken Proben entnommen und in einen einzigen Paraffinblock zusammengeführt. Damit können große Patientenfallzahlen an wenigen histologischen und immunhistologischen Schnitten gleichzeitig untersucht werden. Ein Vorteil dieser Methode ist, daß sie in kurzer Zeit die Begutachtung einer Vielzahl von Proben bei geringem Materialverbrauch erlaubt. Für den TMA wurde der MTA Booster Tissue Arrayer (Alpha Metrix Biotech GmbH, Rödermark, Deutschland) benutzt. Die Ausführung geschah nach Anweisungen des Herstellers. Von jedem Paraffinblock wurden jeweils sechs Proben vom Tumor und der nicht-neoplastischen Kolonschleimhaut mit einem Durchmesser von 0,6 mm entnommen und in einen Empfängerparaffinblock verbracht.

2.5 Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskopes in 100-, 200- und 400-facher Vergrößerung. Es wurden Stenzen aus Tumorgewebe und aus gesundem Kolongewebe untersucht. Pro Patient wurden sechs Stenzen aus Kolonkarzinom sowie sechs Stenzen aus nicht neoplastischer Kolonschleimhaut entnommen und immunhistochemisch gefärbt. Es wurden die Epithelzellen im Tumorgewebe und im gesunden Gewebe auf etwaige immunhistochemische Reaktion untersucht. Die Intensität der Immunreaktion wurde für jede Stanze separat mit 0 (keine Färbung), 1 (geringe Intensität der Färbung), 2 (mittlere Intensität) und 3 (starke Intensität) bewertet. Die einzelnen Bewertungen (0-3) wurden separat für Tumor und Nichttumor addiert und durch

die Anzahl der jeweils untersuchten Stenzen dividiert. Dadurch ergab sich ein Mittelwert der Intensität der immunhistochemischen Färbung pro Patient und Gewebeart (Tumor und Nichttumor). Anschließend wurden die Patienten in Gruppen nach der 6. Auflage der UICC (TNM-Stadium, und Metastasenstatus) sowie nach Differenzierungsgrad eingeteilt (Siehe unten Tabelle 8). Daraufhin wurden noch einmal alle Werte aus jeweils einer Gruppe addiert und durch die Anzahl der Patienten in der Gruppe geteilt, so daß sich ein Mittelwert für die Intensität der immunhistochemischen Färbung pro Gruppe ergab. Des Weiteren wurde dokumentiert, ob die Immunreaktion zytoplasmatisch oder membranär im Kolonepithel vorlag.

2.6 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte anhand zweier Tests. Für den Vergleich der Expression in Tumor- und in gesundem Kolongewebe wurde der gepaarte Wilcoxon-Test angewendet. Dafür wurden immer Proben vom Kolonkarzinom und gesunder Kolonschleimhaut von jeweils einem Patienten verglichen. Für die Überprüfung der Korrelation mit dem TNM-Status wurde der ungepaarte Wilcoxon-Test angewendet. Unterschiede wurden als signifikant bewertet, wenn $p < 0,05$ war. Als grenzwertig signifikant wurde $0,05 \leq p < 0,1$ angenommen.

3. Ergebnisse

Die verschiedenen Proben eines einzelnen Patienten wurden jeweils miteinander verglichen. Also in erster Linie immer 6 Stenzen aus dem Tumorgewebe mit den 6 Stenzen aus dem gesunden Gewebe des gleichen Patienten. So konnte überprüft werden, ob der jeweilige Rezeptor im Tumorgewebe entweder hoch- oder herunterreguliert war, bzw., ob überhaupt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Geweben festgestellt werden konnte. In der weiteren Untersuchung wurde überprüft, ob signifikante Unterschiede mit dem Tumorstadium einhergehen. Hierzu wurden die durchschnittlichen Bewertungen der Intensität der immunhistochemischen Färbungen von Patienten im Tumorstadium T1 und T2 Stadium mit denen von Patienten in den Stadien T3 und T4 verglichen. Die Durchschnittswerte aus der Gruppe des Lymphknotenstadiums (N0 und N1) wurden ebenfalls auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Ebenfalls berücksichtigt wurde der Fernmetastasenstatus M0 und M1.

Tabelle 6: Häufigkeit und mittlere Immunreaktivität

	Tumor: Fälle mit positiver Immunreaktion/ Anzahl untersuchter Fälle	Nichttumor: Fälle mit positiver Immunreaktion/ Anzahl untersuchte Fälle	mittlere Immunreaktivität Tumor	mittlere Immunreaktivität Nichttumor
BRS 3	61/80 (76,3 %)	30/64 (46,9 %)	0,76	0,42
CCKA	59/78 (75,6 %)	30/56 (53,6 %)	0,55	0,48
CXCR 4	63/81 (77,8 %)	33/65 (50,8 %)	0,74	0,46
GHRH	49/82 (59,6 %)	36/65 (55,4 %)	0,43	0,51
GRPR	22/79 (27,8 %)	15/69 (21,7 %)	0,14	0,13
NK 1	79/79 (100 %)	65/68 (95,6 %)	2,37	2,12
NMBR	65/75 (86,6 %)	50/65 (83,3 %)	1,2	0,96
NT 2	64/81 (79,0 %)	54/66 (81,8 %)	1,25	1,37
PAC 1	74/79 (93,7 %)	55/65 (84,6 %)	1,38	1,18
VPAC 1	44/70 (62,9 %)	42/62 (67,7 %)	0,63	0,71
VPAC 2	64/80 (80 %)	64/71 (90,1 %)	0,94	1,74

3.1 Charakterisierung des Untersuchungskollektivs

Das hier untersuchte Kollektiv bestand aus 83 Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation zwischen 35 und 96 Jahren alt gewesen waren, mit einem mittleren Patientenalter von 66 Jahren. Unter den Patienten waren 51 (61,4%) Männer und 32 (38,6%) Frauen.

Die Karzinome stammten in 33 (39,8%) Fällen aus dem Rektum, in 23 (27,7%) Fällen aus dem Sigmoid und in 27 (32,5%) Fällen aus dem Kolon. Darunter wiesen 3 (4%) Fälle Stadium T1, 13 (16%) Fälle Stadium T2, 56 (67%) Fälle Stadium T3 und 10 (12%) Fälle Stadium T4 auf. Ein (1%) Fall konnte nicht zugeordnet werden (Tx).

Des Weiteren fanden sich in 44 (53%) Fällen keine Lymphknotenmetastasen (N0), in 18 (22%) Fällen Metastasen in 1-3 perikolischen, bzw. perirektalen Lymphknoten (LK) (N1), in 16 (19%) Fällen fanden sich Metastasen in 4 oder mehr perikolischen oder perirektalen LK (N2), in 2 (2%) Fällen Metastasen in LK entlang der großen Bauchgefäße (N3) und in 3 (4%) konnten die regionären LK nicht beurteilt werden (NX). Fernmetastasen fanden sich bei 11 (13%) Patienten (M1), 39 (47%) Patienten hatten zum Operationszeitpunkt keine Fernmetastasen (M0) und bei 33 (40%) ließ sich der Fernmetastasenstatus nicht beurteilen (MX). 3 (4%) Tumoren waren gut differenziert (G1), 74 (89%) mäßig (G2) und 6 (7%) gering differenziert (G3). 14 (17%) der Patienten befanden sich im Stadium I nach UICC, 30 (36%) im Stadium IIa, 3 (4%) im Stadium IIb, 3 (4%) im Stadium IIIa, 12 (14%) im Stadium IIIb, 9 (11%) im Stadium IIIc und 12 (14%) im Stadium IV. Zum Zeitpunkt der Einstufung der Patienten nach UICC-Kriterien lag die neue 7. Auflage (2010) der UICC-Klassifikation noch nicht vor, weshalb die Patienten nach den Kriterien der 6. Auflage eingestuft worden waren.

Tabelle 7: Charakteristika des Untersuchungskollektivs

Patient	Geschlecht	Alter	Lokalisation	Stadium	T	N	M	G
1	w	83	Sigma	III B	3	1	0	2
2	M	45	Rektum	I	2	0	0	2
3	M	59	Rektum	III B	3	1	0	2
4	w	79	Rektum	I	2	0	0	2
5	M	79	Rektum	IV	3	2	1	3
6	M	68	Rektum	I	1	0	0	1
7	w	60	Sigma	IV	4	1	1	2
8	w	76	Rektum	III C	3	2	0	2
9	M	60	Rektum	III B	3	1	0	2
10	M	48	Colon	n.b.	X	0	0	2
11	M	70	Sigma	I	2	0	0	2
12	M	50	Rektum	II A	3	0	0	2
13	M	70	Rektum	III C	3	2	x	2
14	w	78	Colon	III B	3	1	0	2
15	w	65	Colon	II A	3	0	0	2
16	w	35	Rektum	II A	3	0	0	2
17	w	52	Colon	III B	3	1	0	2
18	M	65	Rektum	I	1	0	0	2
19	M	80	Sigma	IV	3	3	0	3
20	M	83	Rektum	II A	3	0	0	2
21	M	42	Sigma	II A	3	0	0	2
22	M	63	Rektum	IV	3	2	1	2
23	M	59	Rektum	I	2	0	0	2
24	w	73	Rektum	III C	4	2	0	2
25	w	47	Rektum	III B	3	1	0	2
26	w	73	Colon	II A	3	0	0	2
27	M	63	Sigma	IV	3	3	1	2
28	M	58	Colon	IV	3	1	1	2
29	M	69	Colon	II A	3	0	0	2
30	w	63	Rektum	I	2	0	0	2
31	M	59	Sigma	II A	3	0	0	2
32	w	83	Rektum	II A	3	0	0	2
33	M	62	Rektum	III A	1	1	0	2
34	M	67	Rektum	II A	3	0	0	2
35	w	67	Rektum	II A	3	0	0	2
36	w	67	Rektum	III C	3	2	0	2
37	M	62	Rektum	II A	3	0	0	2
38	w	52	Rektum	II A	3	0	0	2
39	M	63	Rektum	IV	4	1	1	2
40	w	78	Rektum	II A	3	0	0	2
41	M	56	Sigma	III B	3	1	0	2

42	M	60	Sigma	II A	3	0	0	2
43	M	69	Rektum	III A	2	1	0	2
44	M	85	Rektum	I	2	x	0	2
45	M	59	Colon	III C	3	2	0	2
46	W	83	Colon	I	2	0	0	1
47	W	71	Rektum	I	2	0	x	2
48	M	54	Rektum	I	2	0	x	2
49	M	86	Colon	II A	3	0	x	2
50	M	43	Sigma	II B	4	0	x	2
51	W	48	Sigma	II B	4	x	x	2
52	M	91	Sigma	II A	3	0	x	2
53	M	70	Rektum	II A	3	0	x	2
54	W	74	Rektum	I	2	0	x	2
55	M	78	Sigma	III C	3	2	x	2
56	M	62	Sigma	II A	3	0	x	2
57	M	87	Sigma	III B	3	1	x	2
58	M	65	Sigma	IV	3	2	1	2
59	M	63	Sigma	II A	3	0	x	2
60	M	59	Colon	II A	3	0	x	3
61	W	59	Colon asc.	II B	4	0	x	2
62	M	48	Colon	II A	3	0	x	2
63	M	70	Sigma	II A	3	0	x	2
64	W	54	Rektum	III A	2	1	x	2
65	W	78	Colon asc.	II A	3	0	x	2
66	M	56	Colon	II A	3	x	x	2
67	M	80	Colon asc.	III B	3	1	x	2
68	W	41	Colon asc.	II A	3	0	x	2
69	W	62	Colon asc.	III C	4	2	x	3
70	W	73	Colon transv.	III B	3	1	x	2
71	M	78	Colon asc.	II A	3	0	x	2
72	M	81	Colon transv.	III C	3	2	x	2
73	M	65	Colon asc.	II A	3	0	x	2
74	W	74	Colon asc.	IV	4	2	1	2
75	W	77	Rektum	III B	3	1	x	2
76	M	40	Sigma	IV	3	2	1	3
77	W	65	Sigma	II A	3	0	x	1
78	M	59	Sigma	IV	3	2	1	3
79	M	72	Colon desc.	IV	4	2	1	2
80	M	64	Coloc asc.	II A	3	0	x	2
81	M	59	Sigma	III C	3	2	x	2
82	M	69	Colon asc.	III B	4	1	x	2
83	M	67	Sigma	I	2	0	x	2

Tabelle 8: Charakteristika des Patientenkollektivs

Patienten	[n]	83
Alter	[Mittelwert \pm SA]	65,96 \pm 12,15 Jahre
Geschlecht	Männer [n (%)]	51 (61,4)
	Frauen [n (%)]	32 (38,6)
Lokalisierung	Rektum [n (%)]	33 (39,8)
	Sigmoid [n (%)]	23 (27,7)
	Kolon [n (%)]	27 (32,5)
Stadium	p T1 [n (%)]	3 (4)
	p T2 [n (%)]	13 (16)
	p T3 [n (%)]	56 (67)
	p T4 [n (%)]	10 (12)
	p Tx [n (%)]	1 (1)
	p N0 [n (%)]	44 (53)
	p N1 [n (%)]	18 (22)
	p N2 [n (%)]	16 (19)
	p N3 [n (%)]	2 (2)
	p Nx [n (%)]	3 (4)
	p M0 [n (%)]	39 (47)
	p M1 [n (%)]	11 (13)
	p Mx [n (%)]	33 (40)
Grading	G1 [n (%)]	3 (4)
	G2 [n (%)]	74 (89)
	G3 [n (%)]	6 (7)

UICC	St. I [n (%)]	14 (17)
	St. II a [n (%)]	30 (36)
	St. II b [n (%)]	3 (4)
	St. III a [n (%)]	3 (4)
	St. III b [n (%)]	12 (14)
	St. III c [n (%)]	9 (11)
	St. IV [n (%)]	12 (14)

3.2 Expression von BRS 3

(siehe Tabelle 9)

Eine Immunreaktion in Tumorgewebe fand sich für BRS 3 in 61 von 80 (76,3%) untersuchten Fällen. In gesundem Gewebe kam es in 30 von 64 (46,9%) Fällen zu einer Immunreaktion. Als positive Immunreaktion galt jede mit >0 bewertete Intensität, dies gilt auch für alle weiteren untersuchten Rezeptoren.

3.2.1 Verteilung im Gewebe

BRS 3 fand sich in Tumorgewebe sowohl in der Kernmembran als auch im Zytosol der Tumorzellen. Im gesunden Gewebe war BRS 3 ausschließlich im Zytosol des Epithels der Darmmukosa lokalisiert.

3.2.2 Grad der Expression

Die durchschnittliche Bewertung der Intensität der Färbung von BRS 3 lag im Tumorgewebe bei 0,76. Im gesunden Darmgewebe konnte ein Mittelwert von 0,42 erreicht werden.

3.2.3 Statistik

Von den insgesamt 83 Patienten konnte bei 80 Patienten die Immunhistochemie an BRS 3 durchgeführt werden. Bei Nichttumorgewebe war dies in 64 Fällen möglich. Paare Tumor/Nichttumor konnten in 61 Fällen gebildet werden. Bei Mittelwerten von 0,76 im kranken Gewebe und 0,42 im gesunden Gewebe war die Expression von BRS 3 im Tumor stärker als im gesunden Gewebe ($p = 0.0041$). Eine Korrelation mit Tumor-, Lymphknoten oder Metastasenstadium konnte nicht nachgewiesen werden.

Abbildung 1: BRS 3, Nichttumor, Vergrößerung x 200



Abbildung 2: BRS 3, Tumor, Vergrößerung x 400

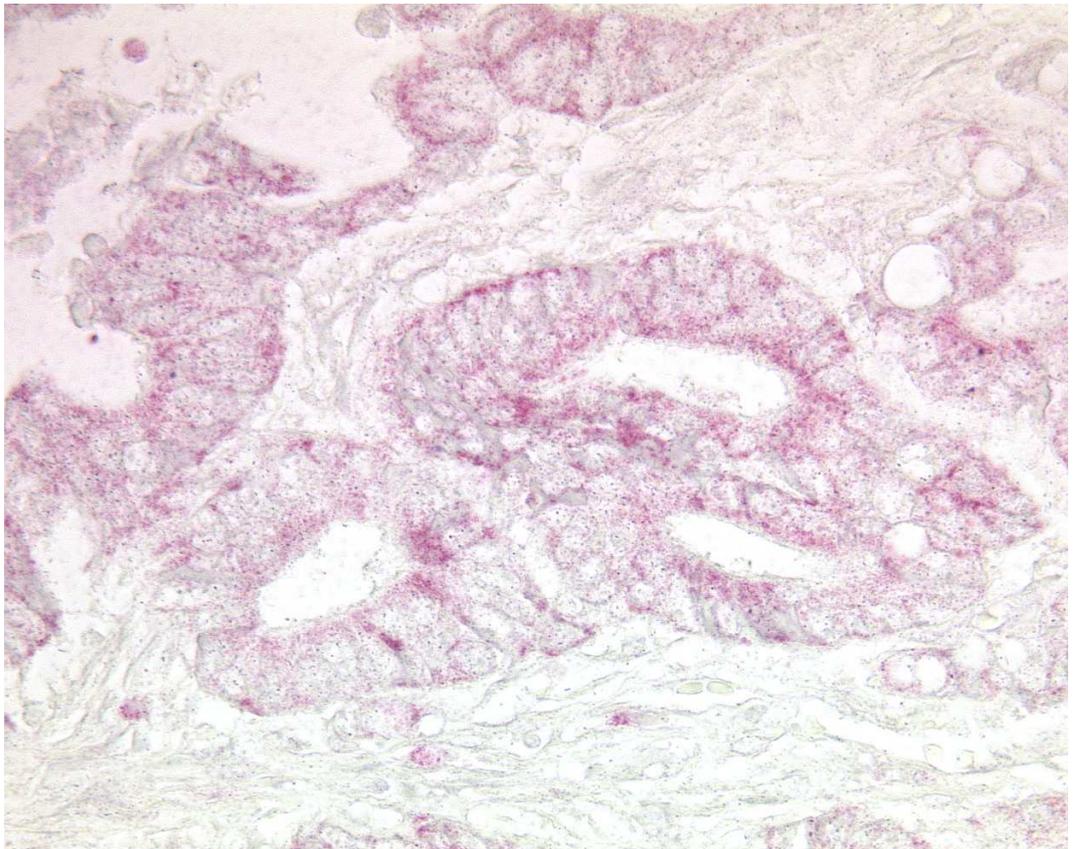


Tabelle 9: Expressionen von BRS 3

Anzahl Patienten Alter [Durchschnitt ± Standard- abweichung (SD)]		83 65,96 ±12,15	BRS 3									
			Alle Fälle Tumor			Alle Fälle Nichttumor			Positive Fälle Tumor		Positive Fälle Nichttumor	
Stadium		Gesamtzahl	Anzahl	Mittelwert	SD	Anzahl	Mittelwert	SD	Anzahl	Mittelwert	Anzahl	Mittelwert
T-Kategorie	p T1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,3	0,255	3 (100)	0,3	0,577	2 (67)	0,4	1 (33)	1,0
	p T2 [n (%)]	13 (16)	13 (100)	0,7	0,617	10 (77)	0,3	0,38	10 (77)	0,9	4 (31)	0,6
	p T3 [n (%)]	56 (67)	53 (95)	0,9	0,716	42 (79)	0,5	0,654	41 (73)	1,1	19 (34)	1,0
	p T4 [n (%)]	10 (12)	10 (100)	0,9	0,81	8 (80)	0,4	0,388	7 (70)	1,3	5 (50)	0,6
	p Tx [n (%)]	1 (1)	1 (100)	0,6	-	1 (100)	0,8	-	1 (100)	0,6	1 (100)	0,8
N-Kategorie	p N0 [n (%)]	44 (53)	42 (95)	0,8	0,746	34 (77)	0,4	0,569	34 (77)	1,0	18 (41)	0,8
	p N1 [n (%)]	18 (22)	17 (94)	0,7	0,648	16 (89)	0,8	0,626	12 (67)	1,0	8 (44)	0,9
	p N2 [n (%)]	16 (19)	16 (100)	0,9	0,626	9 (56)	0,3	0,661	13 (81)	1,1	2 (13)	1,5
	p N3 [n (%)]	2 (2)	2 (100)	0,3	0,471	2 (100)	0,5	0,707	1 (50)	0,7	1(50)	1,0
	p Nx [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,6	1,01	3 (100)	0,1	0,192	1 (33)	1,8	1 (33)	0,3
M-Kategorie	p M0 [n (%)]	39 (47)	38 (97)	0,8	0,642	27 (69)	0,5	0,606	31 (79)	0,9	14 (36)	0,9
	p M1 [n (%)]	11 (13)	11 (100)	0,9	0,704	8 (73)	0,1	0,295	8 (73)	1,2	1 (9)	0,8
	p Mx [n (%)]	33 (40)	31 (94)	0,8	0,781	29 (88)	0,4	0,597	22 (67)	1,2	15 (45)	0,8
Differenzierung	G1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,6	1,058	2 (67)	0,3	0,424	1 (33)	1,8	1 (33)	0,6
	G2 [n (%)]	74 (89)	71 (96)	0,8	0,7	56 (79)	0,4	0,599	55 (74)	1,1	27 (36)	0,9
	G3 [n (%)]	6 (7)	6 (100)	0,9	0,612	6 (100)	0,2	0,4	5 (83)	1,1	2 (33)	0,6
UICC-Stadium	St. I [n (%)]	14 (17)	13 (93)	0,5	0,587	10 (71)	0,3	0,425	9 (64)	0,8	3 (21)	0,8
	St. II a [n (%)]	30 (36)	28 (93)	0,9	0,792	23 (77)	0,4	0,627	22 (73)	1,2	12 (40)	0,8
	St. II b [n (%)]	3 (4)	3 (100)	1,4	0,9	3 (100)	0,6	0,347	3 (100)	1,4	3 (100)	0,6
	St. III a [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,8	0,6	3 (100)	0,4	0,409	3 (100)	1,0	2 (67)	0,5
	St. III b [n (%)]	12 (14)	11 (92)	0,7	0,71	10 (83)	0,6	0,733	7 (58)	1,1	5 (42)	1,1
	St. III c [n (%)]	9 (11)	9 (100)	0,8	0,572	5 (56)	0,6	0,822	7 (78)	0,8	2 (22)	1,5
	St. IV [n (%)]	12 (14)	12 (100)	0,9	0,675	9 (75)	0,2	0,406	9 (75)	1,2	2 (17)	0,9
Vergleich Tumor/Nichttumor		Anzahl der Paare Tumor/ Nichttumor: 61		Mittelwerte: Tumor: 0,76 Nichttumor: 0,42			Standardabweichung: Tumor: 0,72 Nichttumor: 0,59			Signifikanz p: 0,0041		

3.3 Expression von CCKA

(siehe Tabelle 10)

In 59 von 78 (75,6%) Fällen konnte CCKA im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Im gesunden Kolongewebe war dies in 30 von 56 (53,6%) Fällen der Fall.

3.3.1 Verteilung im Gewebe

CCKA war bevorzugt im Zytosol der Darmepithelien der nichtneoplastischen Mukosa, aber auch der Tumorzellen nachweisbar.

In der nichtneoplastischen Darmmukosa war CCKA vor allem im Zytosol der Darmepithelien zu finden. Auch in den Tumorzellen wurde diese Lokalisierung bevorzugt.

3.3.2 Grad der Expression

Der Mittelwert der immunhistochemischen Färbung aller beurteilten Tumorstanzen betrug für CCKA im kolorektalen Karzinom 0,55. Im gesunden Kolongewebe ergab der Durchschnitt aller bewerteten Stenzen 0,48.

3.3.3 Statistik

Bei CCKA konnten insgesamt Proben von 78 Patienten für die Immunhistochemie am Tumorgewebe verwendet werden. Im gesunden Darmgewebe konnten 56 Proben gefärbt werden. Das ergibt 55 Paare Tumor/Nichttumor. Der Vergleich der Farbintensität ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Tumorgewebe und nichtneoplastischer Darmschleimhaut ($p=0,4$). Eine Korrelation mit Tumor-, Lymphknoten oder Metastasenstadium konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 10: Expressionen von CCKA

Anzahl Patienten Alter [Durchschnitt ± Standard- abweichung]		83 65,96 ±12,15	CCKA									
			Alle Fälle Tumor			Alle Fälle Nichttumor			Positive Fälle Tumor		Positive Fälle Nichttu- mor	
Stadium		Gesamtzahl	Anzahl	Mittel- wert	SD	Anzahl	Mittel- wert	SD	Anzahl	Mittel- wert	Anzahl	Mittel- wert
T- Kategorie	p T1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,8	0,675	3 (100)	0,3	0,577	2 (67)	1,1	1 (33)	1,0
	p T2 [n (%)]	13 (16)	11 (85)	0,5	0,59	9 (69)	0,8	0,776	7 (54)	0,7	7 (54)	1,1
	p T3 [n (%)]	56 (67)	53 (95)	0,6	0,565	37 (66)	0,4	0,565	43 (77)	0,8	18 (32)	0,9
	p T4 [n (%)]	10 (12)	10 (100)	0,6	0,634	7 (70)	0,3	0,32	7 (70)	0,8	4 (40)	0,5
	p Tx [n (%)]	1 (1)	1 (100)	0	-	-	-	-	-	-	-	-
N- Kategorie	p N0 [n (%)]	44 (53)	40 (91)	0,7	0,625	29 (66)	0,6	0,62	28 (64)	1,0	18 (41)	0,9
	p N1 [n (%)]	18 (22)	17 (94)	0,5	0,466	14 (78)	0,5	0,658	14 (78)	0,6	17 (94)	1,0
	p N2 [n (%)]	16 (19)	16 (100)	0,6	0,554	8 (50)	0,3	0,444	14 (88)	0,7	4 (25)	0,6
	p N3 [n (%)]	2 (2)	2 (100)	0,4	0,53	2 (100)	0	0	1 (50)	0,8	-	-
	p Nx [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,6	0,804	3 (100)	0,2	0,385	2 (67)	0,9	1 (33)	0,7
M- Kategorie	p M0 [n (%)]	39 (47)	36 (92)	0,7	0,571	23 (59)	0,4	0,581	29 (74)	0,8	10 (26)	0,9
	p M1 [n (%)]	11 (13)	11 (100)	0,5	0,578	7 (64)	0,3	0,389	9 (82)	0,6	3 (27)	0,7
	p Mx [n (%)]	33 (40)	31 (94)	0,6	0,585	26 (79)	0,6	0,638	21 (64)	0,9	17 (52)	0,9
Differen- zierung	G1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0	0,052	3 (100)	0,4	0,509	1 (33)	0,1	2 (67)	0,7
	G2 [n (%)]	74 (89)	69 (93)	0,6	0,588	48 (65)	0,5	0,616	53 (72)	0,8	25 (34)	1,0
	G3 [n (%)]	6 (7)	6 (100)	0,5	0,368	5 (83)	0,3	0,413	5 (83)	0,6	3 (50)	0,5
UICC- Stadium	St. I [n (%)]	14 (17)	11 (79)	0,5	0,652	10 (71)	0,7	0,729	6 (43)	0,9	7 (50)	1,0
	St. II a [n (%)]	30 (36)	28 (93)	0,7	0,602	20 (67)	0,5	0,561	22 (73)	0,9	11 (37)	0,9
	St. II b [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,9	0,822	2 (67)	0,3	0,471	2 (67)	1,4	1 (33)	0,7
	St. III a [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,7	0,355	2 (67)	0,8	1,131	3 (100)	0,7	1 (33)	1,6
	St. III b [n (%)]	12 (14)	11 (92)	0,5	0,527	9 (75)	0,5	0,664	9 (75)	0,6	5 (42)	0,9
	St. III c [n (%)]	9 (11)	9 (100)	0,5	0,492	5 (56)	0,3	0,522	7 (78)	0,7	2 (22)	0,7
	St. IV [n (%)]	12 (14)	12 (100)	0,5	0,556	8 (67)	0,2	0,373	10 (83)	0,6	3 (25)	0,7
Vergleich Tumor/Nichttumor		Anzahl der Paare Tumor/ Nichttumor: 55		Mittelwerte: Tumor: 0,55 Nichttumor: 0,48			Standardabweichung: Tumor: 0,55 Nichttumor: 0,59			Signifikanz p: 0,400		

3.4 Expression von CXCR 4

(Siehe Tabelle 11)

Für CXCR 4 konnte insgesamt in 63 von 81 (77,8%) Fällen im Tumorgewebe eine positive Immunreaktion nachgewiesen werden. Im nicht erkrankten Gewebe war die Immunreaktion in 33 von 65 (50,8%) Fällen positiv.

3.4.1 Verteilung im Gewebe

Im gesunden Darmgewebe fand sich CXCR 4 vor allem im Zytosol der Epithelzellen. Auch in den Tumorzellen war CXCR 4 vorwiegend im Zytosol lokalisiert.

3.4.2 Grad der Expression

Die durchschnittliche Bewertung der Immunhistochemie in malignen Zellen mit CXCR 4 konnte mit 0,74 angegeben werden. In den Epithelien gesunder Kolonmukosa erreichte der Wert 0,46.

3.4.3 Statistik

Bei 81 von 83 Patienten gelang die Immunhistochemie des Tumorgewebes. Bei Nichttumorgewebe lediglich bei 65 Patientenproben. Insgesamt ergaben sich so 63 Paare, in denen jeweils Tumor und Nichttumorummunhistochemie verglichen werden konnten. Der Vergleich der Farbintensitäten konnte einen signifikanten Unterschied zwischen Tumorgewebe und nichtneoplastischer Darmschleimhaut zeigen ($p=0,006$). CXCR 4 ist also im Tumorgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe hochreguliert. Eine Korrelation mit Tumor-, Lymphknoten- oder Metastasenstatus war nicht nachweisbar.

Abbildung 3: CXCR 4, Nichttumor, Vergrößerung x 400

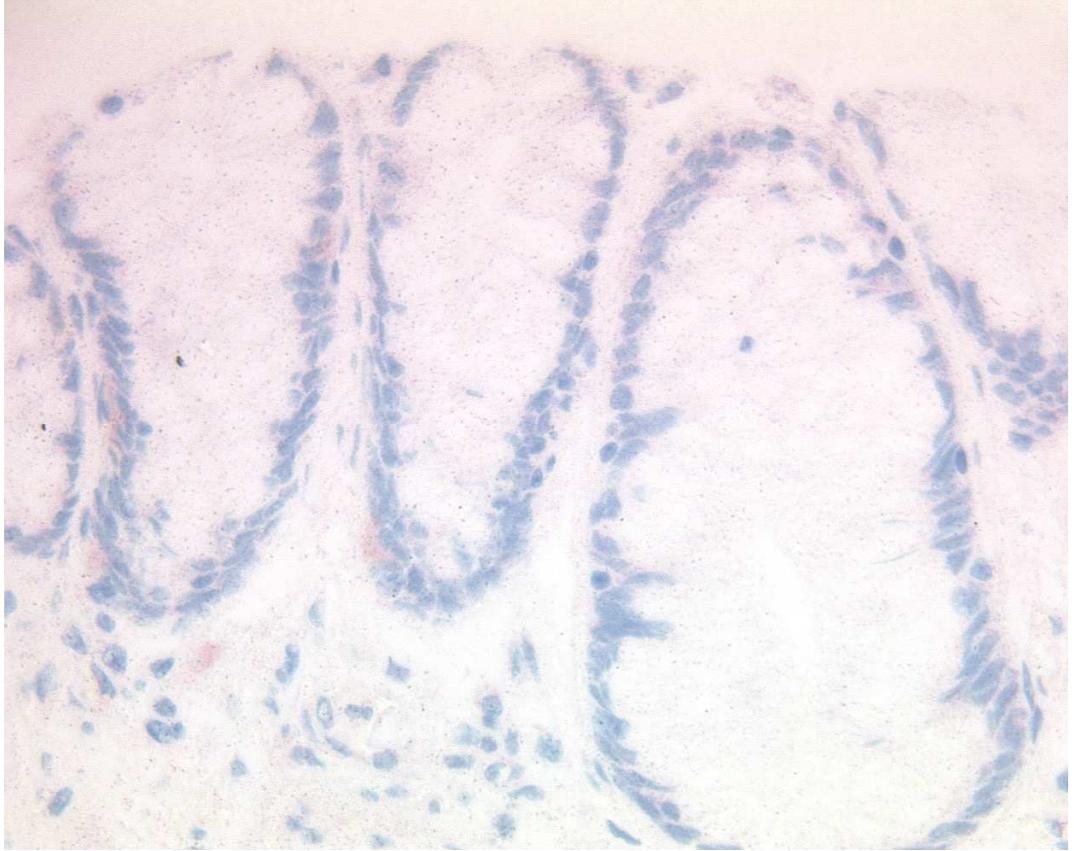


Abbildung 4: CXCR 4, Tumor, Vergrößerung x 400

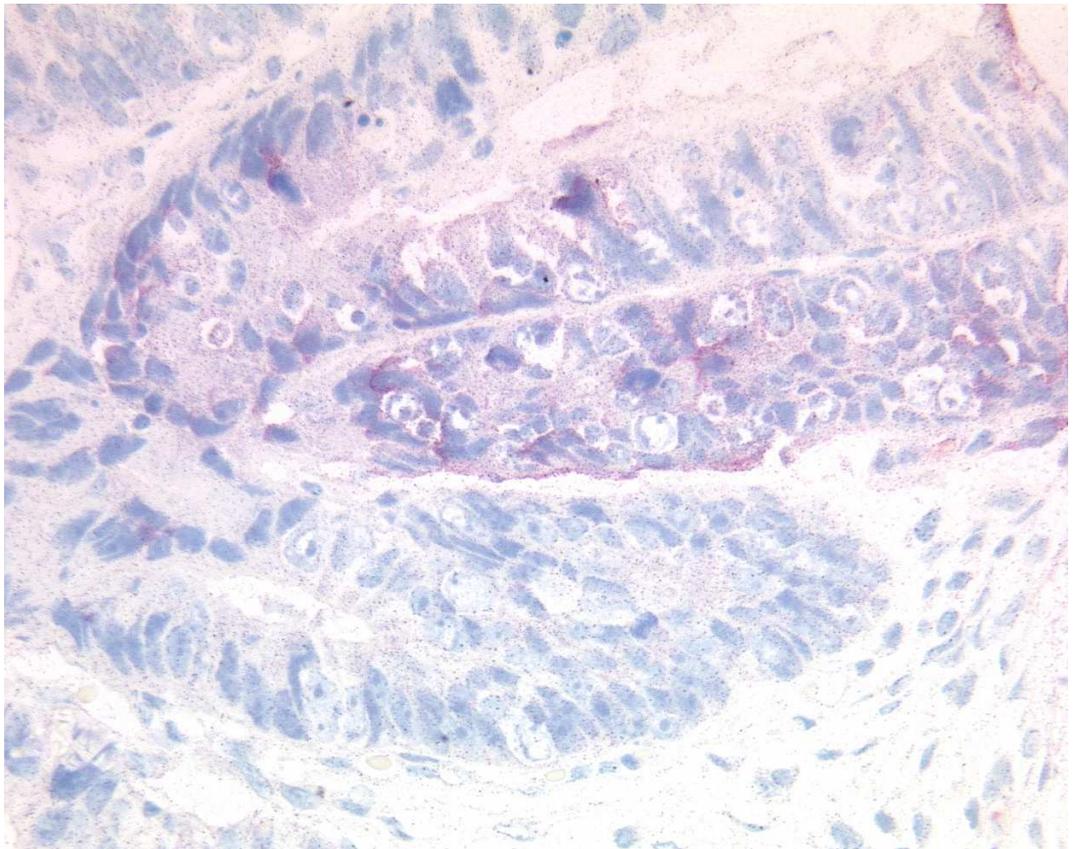


Tabelle 11: Expression von CXCR 4

Anzahl Patienten Alter [Durchschnitt ± Standard- abweichung]		83 65,96 ±12,15	CXCR 4									
			Alle Fälle Tumor			Alle Fälle Nichttumor			Positive Fälle Tumor		Positive Fälle Nichttumor	
Stadium		Gesamtzahl	Anzahl	Mittelwert	SD	Anzahl	Mittelwert	SD	Anzahl	Mittelwert	Anzahl	Mittelwert
T-Kategorie	p T1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,2	0,33	3 (100)	0,1	0,0956	1 (33)	0,6	1 (33)	0,2
	p T2 [n (%)]	13 (16)	12 (92)	0,6	0,512	11 (85)	0,3	0,447	10 (77)	0,7	6 (46)	0,6
	p T3 [n (%)]	56 (67)	55 (98)	0,9	1,046	42 (75)	0,5	0,7	45 (80)	1,1	20 (36)	1,0
	p T4 [n (%)]	10 (12)	10 (100)	0,6	0,842	8 (80)	0,4	0,493	7 (70)	0,9	6 (60)	0,6
	p Tx [n (%)]	1 (1)	1 (100)	0	-	1 (100)	0	-	-	-	-	-
N-Kategorie	p N0 [n (%)]	44 (53)	43 (98)	0,9	1,081	35 (80)	0,5	0,693	35 (80)	1,1	18 (41)	0,9
	p N1 [n (%)]	18 (22)	18 (100)	0,7	0,704	15 (83)	0,4	0,56	13 (72)	0,9	8 (44)	0,7
	p N2 [n (%)]	16 (19)	16 (100)	0,5	0,741	10 (63)	0,4	0,579	11 (69)	0,8	4 (25)	1,0
	p N3 [n (%)]	2 (2)	2 (100)	0,6	0,566	2 (100)	0,5	0,707	2 (100)	0,6	1 (50)	1,0
	p Nx [n (%)]	3 (4)	2 (67)	1,9	1,187	3 (100)	0,5	0,397	2 (67)	1,9	2 (67)	0,7
M-Kategorie	p M0 [n (%)]	39 (47)	38 (97)	0,8	1,11	27 (71)	0,3	0,485	31 (79)	1,0	10 (26)	0,8
	p M1 [n (%)]	11 (13)	11 (100)	0,2	0,252	9 (82)	0,2	0,373	7 (64)	0,4	3 (27)	0,7
	p Mx [n (%)]	33 (40)	32 (97)	0,9	0,838	29 (88)	0,6	0,737	25 (76)	1,2	20 (61)	0,9
Differenzierung	G1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,3	0,577	3 (100)	0,4	0,742	1 (33)	1,0	1 (33)	1,3
	G2 [n (%)]	74 (89)	72 (97)	0,8	0,975	56 (76)	0,5	0,64	59 (80)	1,0	31 (42)	0,9
	G3 [n (%)]	6 (7)	6 (100)	0,5	0,744	6 (100)	0,1	0,136	3 (50)	1,1	1 (16)	0,3
UICC-Stadium	St. I [n (%)]	14 (17)	12 (86)	0,5	0,51	11 (79)	0,3	0,399	9 (64)	0,7	5 (36)	0,6
	St. II a [n (%)]	30 (36)	29 (97)	1,1	1,238	23 (77)	0,5	0,769	25 (83)	1,3	12 (40)	1,0
	St. II b [n (%)]	3 (4)	3 (100)	1,5	1,066	3 (100)	0,9	0,591	3 (100)	1,5	3 (100)	0,9
	St. III a [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,4	0,536	3 (100)	0,4	0,536	2 (67)	0,6	2 (67)	0,6
	St. III b [n (%)]	12 (14)	12 (100)	0,9	0,763	9 (75)	0,4	0,669	9 (75)	1,1	4 (33)	0,8
	St. III c [n (%)]	9 (11)	9 (100)	0,7	0,929	5 (56)	0,8	0,614	7 (78)	0,9	4 (44)	1,0
	St. IV [n (%)]	12 (14)	12 (100)	0,3	0,325	10 (83)	0,2	0,358	8 (67)	0,5	3 (25)	0,7
Vergleich Tumor/Nichttumor		Anzahl der Paare Tumor/ Nichttumor: 63		Mittelwerte: Tumor: 0,74 Nichttumor: 0,46			Standardabweichung: Tumor: 0,74 Nichttumor: 0,63			Signifikanz p: 0.006		

3.5 Expression von GHRH

(Siehe Tabelle 12)

Eine positive Immunreaktion wurde im Tumorgewebe in 49 von 82 (59,6%) Patienten gefunden. Bei Proben aus gesundem Kolongewebe in 36 von 65 (55,4%) Fällen.

3.5.1 Verteilung im Gewebe

GHRH war im maligne entarteten Gewebe im Zytosol der Tumorzellen, aber auch in der gesunden Darmmukosa vor allem im Zytosol der Epithelzellen der Darmmukosa zu finden.

3.5.2 Grad der Expression

Die mittlere Intensität der Färbung lag im Karzinomgewebe bei 0,43, bei gesundem Gewebe bei 0,51.

3.5.3 Statistik

Die immunhistochemische Färbung gelang bei Proben des Tumorgewebes von 82 Patienten. Bei 65 Patienten konnte auch im Gesunden die Färbung durchgeführt werden. Es ergaben sich somit 64 Fälle in denen Tumor mit gesundem Gewebe von jeweils dem gleichen Patienten verglichen werden konnten. Der Vergleich der Farbintensität ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Tumorgewebe und nichtneoplastischer Darmschleimhaut ($p=0,374$). Eine Korrelation mit Tumor-, Lymphknoten oder Metastasenstadium konnte nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 12: Expression von GHRH

Anzahl Patienten Alter [Durchschnitt ± Standard- abweichung]		83 65,96 ±12,15	GHRH									
			Alle Fälle Tumor			Alle Fälle Nichttumor			Positive Fälle Tumor		Positive Fälle Nichttu- mor	
Stadium		Gesamtzahl	Anzahl	Mittelwert	SD	Anzahl	Mittelwert	SD	Anzahl	Mittelwert	Anzahl	Mittelwert
T-Kategorie	p T1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,1	0,231	3 (100)	0,1	0,192	1 (33)	0,4	1 (33)	0,3
	p T2 [n (%)]	13 (16)	13 (100)	0,2	0,273	12 (92)	0,3	0,402	7 (54)	0,4	6 (46)	0,6
	p T3 [n (%)]	56 (67)	55 (98)	0,5	0,577	41 (73)	0,6	0,640	37 (66)	0,8	25 (45)	0,9
	p T4 [n (%)]	10 (12)	10 (100)	0,2	0,328	8 (80)	0,1	0,183	3 (30)	0,6	3 (30)	0,3
	p Tx [n (%)]	1 (1)	1 (100)	0,7	-	1 (100)	1,0	-	1 (100)	0,7	1 (100)	1,0
N-Kategorie	p N0 [n (%)]	44 (53)	43 (98)	0,5	0,573	34 (77)	0,5	0,646	28 (64)	0,8	21 (48)	0,9
	p N1 [n (%)]	18 (22)	18 (100)	0,3	0,482	17 (94)	0,4	0,477	8 (44)	0,6	10 (56)	0,7
	p N2 [n (%)]	16 (19)	16 (100)	0,4	0,393	9 (56)	0,3	0,472	11 (69)	0,5	4 (25)	0,7
	p N3 [n (%)]	2 (2)	2 (100)	0,6	0,786	2 (100)	0,5	0,707	1 (50)	1,1	1 (50)	1,0
	p Nx [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,3	0,577	3 (100)	0	0	1 (33)	1,0	-	-
M-Kategorie	p M0 [n (%)]	39 (47)	39 (100)	0,4	0,556	28 (72)	0,5	0,598	22 (56)	0,7	16 (41)	0,8
	p M1 [n (%)]	11 (13)	11 (100)	0,3	0,316	8 (73)	0,1	0,182	5 (45)	0,6	4 (36)	0,3
	p Mx [n (%)]	33 (40)	32 (97)	0,5	0,527	29 (88)	0,5	0,601	22 (67)	0,8	16 (48)	0,9
Differenzierung	G1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,1	0,093	3 (100)	0,1	0,231	2 (67)	0,2	1 (33)	0,4
	G2 [n (%)]	74 (89)	73 (99)	0,4	0,532	56 (76)	0,5	0,583	43 (58)	0,7	32 (43)	0,8
	G3 [n (%)]	6 (7)	6 (100)	0,6	0,49	6 (100)	0,5	0,581	4 (67)	0,9	3 (50)	0,9
UICC-Stadium	St. I [n (%)]	14 (17)	13 (93)	0,2	0,278	12 (86)	0,2	0,379	7 (50)	0,4	5 (36)	0,6
	St. II a [n (%)]	30 (36)	29 (97)	0,6	0,642	21 (70)	0,7	0,722	20 (67)	0,9	15 (50)	1,0
	St. II b [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,3	0,577	3 (100)	0	0	1 (33)	1,0	-	-
	St. III a [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,1	0,104	3 (100)	0,4	0,402	1 (33)	0,1	2 (67)	0,6
	St. III b [n (%)]	12 (14)	12 (100)	0,4	0,562	11 (92)	0,5	0,551	6 (50)	0,7	6 (50)	0,8
	St. III c [n (%)]	9 (11)	9 (100)	0,4	0,445	5 (56)	0,4	0,607	7 (78)	0,5	2 (22)	1,1
	St. IV [n (%)]	12 (14)	12 (100)	0,3	0,389	9 (75)	0,2	0,332	6 (50)	0,7	5 (42)	0,4
Vergleich Tumor/Nichttumor		Anzahl der Paare Tumor/ Nichttumor:		Mittelwerte:			Standardabweichung:			Signifikanz p:		
		64		Tumor: 0,43 Nichttumor: 0,51			Tumor: 0,43 Nichttumor: 0,58			0,374		

3.6 Expression von GRPR

(Siehe Tabelle 13)

In 22 von 79 (27,8%) Patientenproben des Tumorgewebes zeigte sich eine positive Immunreaktion. Im nicht erkrankten Kolongewebe zeigte sich in 15 von 69 (21,7%) Fällen eine Immunreaktion.

3.6.1 Verteilung im Gewebe

GRPR findet sich im Gegensatz zu den meisten anderen untersuchten Rezeptoren nicht zytosolisch sondern vor allem membranär. Das gilt sowohl für Tumorzellen als auch für gesunde Epithelzellen der Darmmukosa.

3.6.2 Grad der Expression

Die mittlere Farbintensität betrug für GRPR im Tumorgewebe 0,14 und in der gesunden Mukosa 0,13.

3.6.3 Statistik

Es fanden sich 66 Patienten, bei denen eine Färbung sowohl im gesunden als auch im erkrankten Gewebe möglich war. Bei 66 Patienten konnten sowohl Tumor und nichtneoplastisches Gewebe miteinander verglichen werden. Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der Expression des GRPR ($p=0,8$). Eine Korrelation mit Tumor-, Lymphknoten oder Metastasenstadium lag auch hier nicht vor.

Tabelle 13: Expression von GPRP

Anzahl Patienten Alter [Durchschnitt ± Standard- abweichung]		83 65,96 ±12,15	GPRP									
			Alle Fälle Tumor			Alle Fälle Nichttumor			Positive Fälle Tumor		Positive Fälle Nichttu- mor	
Stadium		Gesamtzahl	Anzahl	Mittel- wert	SD	Anzahl	Mittel- wert	SD	Anzahl	Mittel- wert	Anzahl	Mittel- wert
T- Kategorie	p T1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0	0	3 (100)	0	0	-	-	-	-
	p T2 [n (%)]	13 (16)	12 (92)	0,1	0,195	11 (85)	0,1	0,215	2 (15)	0,5	1 (8)	0,7
	p T3 [n (%)]	56 (67)	53 (95)	0,2	0,333	46 (82)	0,2	0,319	16 (29)	0,6	12 (21)	0,6
	p T4 [n (%)]	10 (12)	10 (100)	0,1	0,259	8 (80)	0	0,118	3 (30)	0,5	1 (10)	0,3
	p Tx [n (%)]	1 (1)	1 (100)	0,3	-	1 (100)	0,1	-	1 (100)	0,3	1 (100)	0,7
N- Kategorie	p N0 [n (%)]	44 (53)	41 (93)	0,2	0,294	39 (87)	0,1	0,209	13 (30)	0,5	7 (16)	0,5
	p N1 [n (%)]	18 (22)	18 (100)	0,1	0,206	16 (89)	0,2	0,365	3 (17)	0,4	3 (17)	0,9
	p N2 [n (%)]	16 (19)	15 (94)	0,2	0,396	10 (63)	0,1	0,219	4 (25)	0,8	3 (19)	0,4
	p N3 [n (%)]	2 (2)	2 (100)	0,1	0,1	2 (100)	0,1	0,378	1 (50)	0,1	2 (100)	0,9
	p Nx [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,3	0,433	2 (67)	0	0	1 (33)	0,8	-	-
M- Kategorie	p M0 [n (%)]	39 (47)	38 (97)	0,2	0,27	28 (72)	0,2	0,298	15 (38)	0,4	7 (18)	0,6
	p M1 [n (%)]	11 (13)	11 (100)	0,2	0,378	9 (82)	0,2	0,402	2 (18)	0,9	2 (18)	0,8
	p Mx [n (%)]	33 (40)	30 (91)	0,1	0,31	32 (97)	0,1	0,249	5 (15)	0,7	6 (18)	0,6
Differen- zierung	G1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,2	0,337	3 (100)	0,2	0,412	1 (33)	0,6	1 (33)	0,7
	G2 [n (%)]	74 (89)	70 (95)	0,2	0,309	60 (81)	0,1	0,288	19 (26)	0,6	13 (18)	0,6
	G3 [n (%)]	6 (7)	6 (100)	0,1	0,137	6 (100)	0,1	0,272	2 (33)	0,2	1 (17)	0,7
UICC- Stadium	St. I [n (%)]	14 (17)	12 (86)	0,1	0,195	11 (79)	0,1	0,215	2 (14)	0,5	1 (7)	0,7
	St. II a [n (%)]	30 (36)	28 (93)	0,2	0,329	26 (87)	0,1	0,178	9 (30)	0,5	4 (13)	0,4
	St. II b [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,4	0,376	3 (100)	0,1	0,192	2 (67)	0,5	1 (33)	0,3
	St. III a [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0	0	3 (100)	0	0	-	-	-	-
	St. III b [n (%)]	12 (14)	12 (100)	0,1	0,216	10 (83)	0,3	0,439	2 (17)	0,4	3 (25)	0,9
	St. III c [n (%)]	9 (11)	8 (89)	0,2	0,369	5 (56)	0,2	0,274	3 (33)	0,6	2 (22)	0,5
	St. IV [n (%)]	12 (14)	12 (100)	0,2	0,36	10 (83)	0,2	0,41	3 (25)	0,6	3 (25)	0,7
Vergleich Tumor/Nichttumor		Anzahl der Paare Tumor/ Nichttumor:		Mittelwerte:			Standardabweichung:			Signifikanz p:		
		66		Tumor: 0,14 Nichttumor: 0,13			Tumor: 0,27 Nichttumor: 0,29			0,8		

3.7 Expression von NK 1

(Siehe Tabelle 14)

Eine positive Immunreaktion konnte für NK 1 im Tumorgewebe in allen 79 (100%) untersuchten Proben nachgewiesen werden. Im gesunden Kolongewebe war dies in 65 von 68 (95,6%) Fällen möglich.

3.7.1 Verteilung im Gewebe

Auch NK 1 war vorwiegend im Zytosol sowohl der Tumorzellen als auch der Epithelien der gesunden Darmmukosa lokalisiert.

3.7.2 Grad der Expression

Die Intensität der immunhistochemischen Färbung betrug im Mittel für NK 1 im Tumorgewebe 2,37 und im gesunden Kolongewebe 2,12.

3.7.3 Statistik

Von den 83 Patienten war es bei 79 Patienten möglich, die Stenzen aus dem Tumorgewebe zu beurteilen. Im Gesunden traf dies auf Stenzen von 65 Patienten zu. Insgesamt ergibt das 66 Patienten, bei denen ein Vergleich Tumor/Nichttumor möglich war. Der Vergleich der Farbintensität ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Tumorgewebe und nichtneoplastischer Darmschleimhaut ($p=0,442$). Eine Korrelation mit Tumor-, Lymphknoten oder Metastasenstadium konnte auch für NK 1 nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 14: Expression von NK 1

Anzahl Patienten Alter [Durchschnitt ± Standard- abweichung]		total 83 65,96 ±12,15	NK 1									
			Alle Fälle Tumor			Alle Fälle Nichttumor			Positive Fälle Tumor		Positive Fälle Nichttu- mor	
Stadium		Gesamtzahl	Anzahl	Mittel- wert	SD	Anzahl	Mittel- wert	SD	Anzahl	Mittel- wert	Anzahl	Mittel- wert
T- Kategorie	p T1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	2,3	1,155	3 (100)	2,1	0,839	3 (100)	2,3	3 (100)	2,1
	p T2 [n (%)]	13 (16)	12 (92)	2,5	0,557	12 (92)	1,8	0,958	12 (92)	2,5	11 (85)	1,9
	p T3 [n (%)]	56 (67)	53 (95)	2,3	0,735	44 (79)	2,1	0,746	53 (95)	2,3	42 (75)	2,2
	p T4 [n (%)]	10 (12)	10 (100)	2,2	0,62	8 (80)	2,3	0,73	10 (100)	2,2	8 (80)	2,3
	p Tx [n (%)]	1 (1)	1 (100)	2,8	-	1 (100)	1,9	-	1 (100)	2,8	1 (100)	1,9
N- Kategorie	p N0 [n (%)]	44 (53)	42 (95)	2,2	0,711	36 (82)	2,0	0,642	42 (95)	2,2	35 (80)	2,1
	p N1 [n (%)]	18 (22)	18 (100)	2,5	0,73	17 (94)	2,0	0,747	18 (100)	2,5	17 (94)	2,1
	p N2 [n (%)]	16 (19)	15 (94)	2,3	0,676	10 (63)	2,3	0,995	15 (94)	2,3	9 (56)	2,6
	p N3 [n (%)]	2 (2)	2 (100)	2,8	0,236	2 (100)	2,7	0,424	2 (100)	2,8	2 (200)	2,7
	p Nx [n (%)]	3 (4)	2 (67)	2,9	0,202	3 (100)	1,9	1,665	2 (67)	2,9	2 (67)	2,9
M- Kategorie	p M0 [n (%)]	39 (47)	37 (95)	2,3	0,743	30 (81)	1,9	0,802	37 (95)	2,3	28 (72)	2,1
	p M1 [n (%)]	11 (13)	11 (100)	2,1	0,66	9 (82)	2,0	1,066	11 (100)	2,1	8 (73)	2,2
	p Mx [n (%)]	33 (40)	31 (94)	2,3	0,677	29 (88)	2,2	0,641	31 (94)	2,3	29 (88)	2,2
Differen- zierung	G1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	2,0	1	3 (100)	1,7	0,342	3 (100)	2,0	3 (100)	1,7
	G2 [n (%)]	74 (89)	70 (95)	2,3	0,683	59 (80)	2,1	0,742	70 (95)	2,3	57 (77)	2,2
	G3 [n (%)]	6 (7)	6 (100)	2,1	0,848	6 (100)	2,2	1,166	6 (100)	2,1	5 (83)	2,6
UICC- Stadium	St. I [n (%)]	14 (17)	12 (86)	2,4	0,701	12 (86)	1,8	0,931	12 (86)	2,4	11 (79)	2,0
	St. II a [n (%)]	30 (36)	28 (93)	2,1	0,738	23 (77)	2,0	0,647	28 (93)	2,1	22 (73)	2,1
	St. II b [n (%)]	3 (4)	3 (100)	2,5	0,5	3 (100)	2,8	0,25	3 (100)	2,5	3 (100)	2,8
	St. III a [n (%)]	3 (4)	3 (100)	2,8	0,33	3 (100)	2,0	1	3 (100)	2,8	3 (100)	2,0
	St. III b [n (%)]	12 (14)	12 (100)	2,4	0,79	11 (92)	2,1	0,619	12 (100)	2,4	11 (92)	2,1
	St. III c [n (%)]	9 (11)	8 (89)	2,5	0,662	5 (56)	2,7	0,435	8 (89)	2,5	5 (56)	2,7
	St. IV [n (%)]	12 (14)	12 (100)	2,2	0,676	10 (83)	2,1	1,058	12 (100)	2,2	9 (75)	2,3
Vergleich Tumor/Nichttumor		Anzahl der Paare Tumor/ Nichttumor: 66		Mittelwerte: Tumor: 2,37 Nichttumor: 2,12			Standardabweichung: Tumor: 0,665 Nichttumor: 0,793			Signifikanz p: 0,442		

3.8 Expression von NMBR

(Siehe Tabelle 15)

In 65 von 75 (86,6 %) Proben des untersuchten Tumorgewebes konnte eine positive Immunreaktion nachgewiesen werden, bei dem nichttumorösen Kolongewebe war dies in 50 von 65 (83,3%) Fällen der Fall.

3.8.1 Verteilung im Gewebe

Die Lokalisierung von NMBR konnte sowohl in den Tumorzellen als auch im gesunden Kolonepithel vorwiegend im Zytosol nachgewiesen werden.

3.8.2 Grad der Expression

Im Tumorgewebe lag die durchschnittliche Intensität der immunhistochemischen Färbung für NMBR bei 1,2. In der gesunden Darmmukosa lag die durchschnittliche Bewertung bei 0,96.

3.8.3 Statistik

Die Immunhistochemie des Tumorgewebes konnte bei NMBR bei 75 von 83 Patienten ausgewertet werden. Bei 65 Patientenproben war dies auch im gesunden Gewebe möglich. Zum Vergleich Tumor/ Nichttumor eigneten sich 60 Patientenproben.

NMBR war im Tumor stärker exprimiert als in der nicht neoplastischen Schleimhaut, ohne jedoch Signifikanzniveau ($p=0,074$) zu erreichen. NMBR wurde somit als „grenzwertig signifikant“ eingestuft. Als grenzwertig signifikant galt $0,05 \leq p < 0,1$. Unter Berücksichtigung dieser grenzwertigen Signifikanz ist NMBR im Tumor ebenfalls als hochreguliert zu betrachten. Ähnlich verhält es sich beim Tumorstadium. Tumorstadium T3/4 war im Vergleich zum Tumorstadium T1/2 grenzwertig signifikant ($p= 0,071$) verstärkt exprimiert. Für den Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus ließ sich keine Korrelation feststellen.

Abbildung 5: NMBR, Nichttumor, Vergrößerung x 200

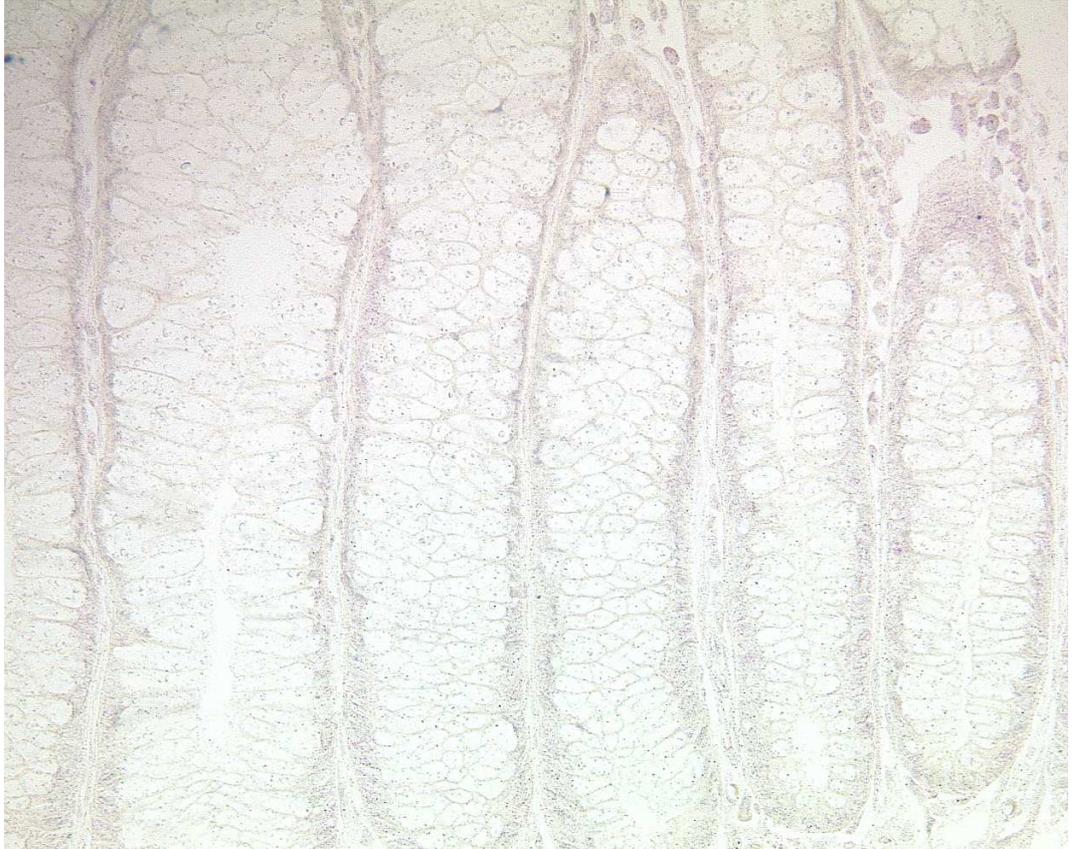


Abbildung 6: NMBR, Tumor, Vergrößerung x 400

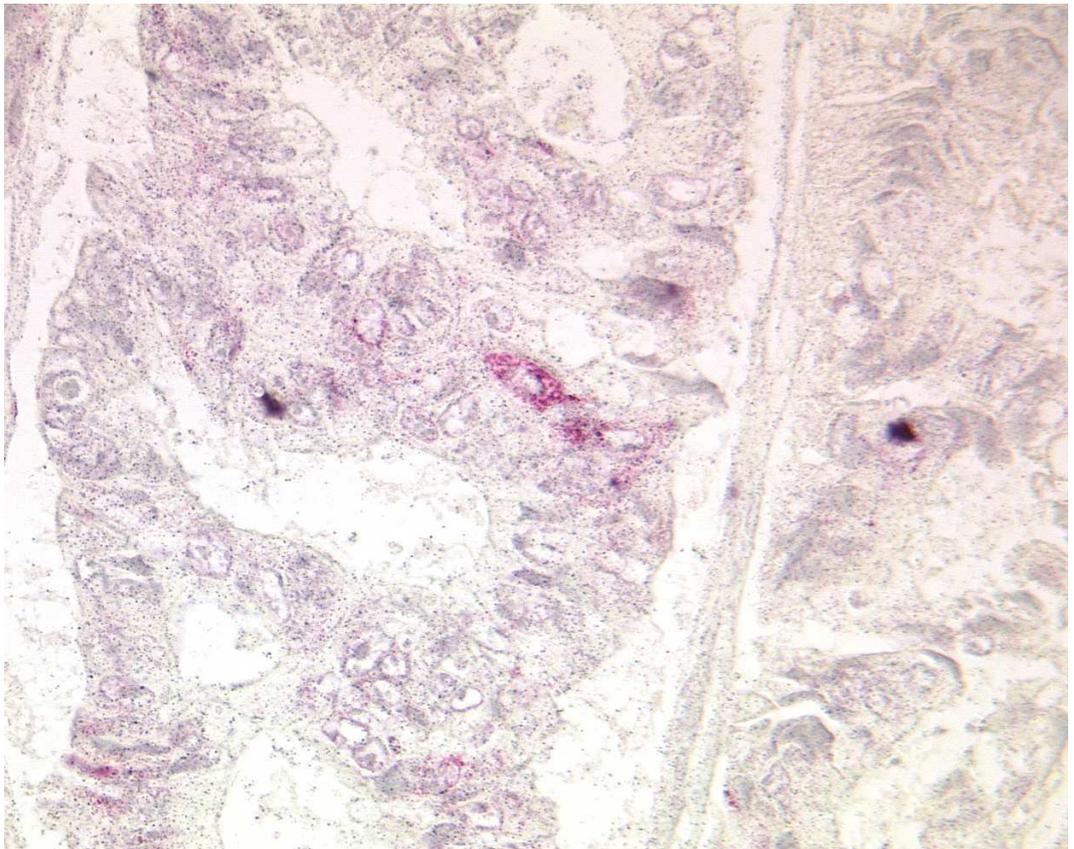


Tabelle 15: Expression von NMBR

Anzahl Patienten Alter [Durchschnitt ± Standard- abweichung]		83 65,96 ±12,15	NMBR									
			Alle Fälle Tumor			Alle Fälle Nichttumor			Positive Fälle Tumor		Positive Fälle Nichttu- mor	
Stadium		Gesamtzahl	Anzahl	Mittel- wert	SD	Anzahl	Mittel- wert	SD	Anzahl	Mittel- wert	Anzahl	Mittel- wert
T- Kategorie	p T1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	1,2	0,721	3 (100)	0,9	1,018	3(100)	1,2	2 (67)	1,3
	p T2 [n (%)]	13 (16)	11 (85)	1,5	0,708	11 (85)	0,9	0,925	11 (85)	1,5	8 (62)	1,2
	p T3 [n (%)]	56 (67)	50 (89)	1,0	0,855	43 (77)	1,0	0,819	42 (75)	1,2	34 (61)	1,2
	p T4 [n (%)]	10 (12)	10 (100)	1,1	0,884	8 (80)	1,0	1,134	9 (90)	1,2	6 (60)	1,3
	p Tx [n (%)]	1 (1)	1 (100)	0	-	-	-	-	-	-	-	-
N- Kategorie	p N0 [n (%)]	44 (53)	40 (91)	1,1	0,856	34 (77)	0,9	0,785	34 (77)	1,3	28 (64)	1,1
	p N1 [n (%)]	18 (22)	18 (100)	1,1	0,921	16 (89)	1,1	1,034	16 (89)	1,3	11 (61)	1,6
	p N2 [n (%)]	16 (19)	14 (88)	0,8	0,606	10 (63)	0,6	0,711	12 (75)	0,9	7 (44)	0,9
	p N3 [n (%)]	2 (2)	1 (50)	2,3	-	2 (100)	2,4	0,53	1 (50)	2,3	2 (100)	2,4
	p Nx [n (%)]	3 (4)	2 (67)	1,2	1,143	3 (100)	0,4	0,409	2 (67)	1,2	2 (67)	0,5
M- Kategorie	p M0 [n (%)]	39 (47)	36 (92)	1,1	0,864	26 (67)	1,1	0,899	30 (77)	1,3	21 (54)	1,4
	p M1 [n (%)]	11 (13)	9 (82)	0,7	0,398	9 (82)	1,0	1,16	9 (82)	0,7	6 (55)	1,5
	p Mx [n (%)]	33 (40)	30 (91)	1,2	0,891	30 (91)	0,8	0,72	26 (79)	1,4	23 (70)	1,0
Differen- zierung	G1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	1,4	0,394	3 (100)	0,7	0,028	3 (100)	1,4	3 (100)	0,7
	G2 [n (%)]	74 (89)	67 (91)	1,1	0,849	56 (76)	1,0	0,887	58 (78)	1,3	44 (59)	1,2
	G3 [n (%)]	6 (7)	5 (83)	1,0	0,938	6 (100)	0,7	0,905	4 (67)	1,3	3 (50)	1,5
UICC- Stadium	St. I [n (%)]	14 (17)	11 (79)	1,4	0,693	11 (79)	0,8	0,926	11 (79)	1,4	8 (57)	1,2
	St. II a [n (%)]	30 (36)	27 (90)	1,0	0,832	23 (77)	0,9	0,68	22 (73)	1,2	19 (63)	1,1
	St. II b [n (%)]	3 (4)	3 (100)	2,0	1	3 (100)	1,0	1,179	3 (100)	2,0	3 (100)	1,0
	St. III a [n (%)]	3 (4)	3 (100)	1,3	0,838	3 (100)	0,9	1,01	3 (100)	1,3	2 (67)	1,4
	St. III b [n (%)]	12 (14)	12 (100)	1,1	1,059	10 (83)	1,2	1,035	10 (83)	1,4	7 (58)	1,6
	St. III c [n (%)]	9 (11)	8 (89)	0,9	0,73	5 (56)	0,7	0,663	6 (67)	1,2	4 (44)	0,8
	St. IV [n (%)]	12 (14)	10 (83)	0,9	0,616	10 (83)	1,1	1,14	10 (83)	0,9	7 (58)	1,6
Vergleich Tumor/Nichttumor		Anzahl der Paare Tumor/ Nichttumor: 60		Mittelwerte: Tumor: 1,2 Nichttumor: 0,96			Standardabweichung: Tumor: 0,83 Nichttumor: 0,84			Signifikanz p: 0.074		

3.9 Expression von NT 2

(Siehe Tabelle 16)

In 64 von 81 (79 %) Patientenproben des Tumorgewebes zeigte sich eine positive Immunreaktion. Im nicht erkrankten Kolongewebe zeigte sich in 54 von 66 (81,8%) Fällen eine Immunreaktion.

3.9.1 Verteilung im Gewebe

Die Verteilung von NT 2 in Tumorgewebe beschränkte sich auf das Zytosol der Zellen. In den Zellen des gesunden Gewebes hingegen war NT 2 eher an der Kernmembran zu finden.

3.9.2 Grad der Expression

Im Tumor konnte die durchschnittliche Intensität der immunhistochemischen Färbung bei 1,25 festgelegt werden. In der gesunden Darmmukosa betrug der Wert 1,37.

3.9.3 Statistik

In 81 von 83 Fällen war es möglich, die Immunhistochemie an Tumorgewebe durchzuführen. In nichtneoplastischem Gewebe gelang dies in 66 Fällen, was so auch zu 66 Paarungen Tumor/ Nichttumor führte. Der Vergleich der Farbintensität konnte keinen signifikanten Unterschied zwischen Tumorgewebe und nicht-neoplastischem Gewebe nachweisen ($p=0,482$). Eine Korrelation mit Tumor-, Lymphknoten oder Metastasenstadium konnte nicht festgestellt werden.

Tabelle 16: Expression von NT 2

Anzahl Patienten Alter [Durchschnitt ± Standard- abweichung]		83 65,96 ±12,15	NT 2									
			Alle Fälle Tumor			Alle Fälle Nichttumor			Positive Fälle Tumor		Positive Fälle Nichttu- mor	
Stadium		Gesamtzahl	Anzahl	Mittel- wert	SD	Anzahl	Mittel- wert	SD	Anzahl	Mittel- wert	Anzahl	Mittel- wert
T- Kategorie	p T1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,9	1,501	3 (100)	0,2	0,192	1 (33)	2,6	2 (67)	1,6
	p T2 [n (%)]	13 (16)	12 (92)	0,9	0,784	11 (85)	1,3	1,172	8 (62)	1,4	8 (62)	1,9
	p T3 [n (%)]	56 (67)	55 (98)	1,2	0,912	43 (77)	1,4	1,055	45 (80)	1,5	36 (64)	1,6
	p T4 [n (%)]	10 (12)	10 (100)	1,5	0,747	8 (80)	1,6	1,019	9 (90)	1,7	7 (70)	1,9
	p Tx [n (%)]	1 (1)	1 (100)	0,7	-	1 (100)	2,0	-	1 (100)	0,7	1 (100)	1,0
N- Kategorie	p N0 [n (%)]	44 (53)	42 (95)	1,1	0,877	37 (84)	1,4	1,01	36 (82)	1,3	33 (75)	1,6
	p N1 [n (%)]	18 (22)	16 (89)	1,2	0,992	16 (89)	1,5	1,226	13 (72)	1,7	12 (67)	1,9
	p N2 [n (%)]	16 (19)	9 (56)	1,3	0,837	9 (56)	1,2	1,141	14 (88)	1,5	7 (44)	1,6
	p N3 [n (%)]	2 (2)	2 (100)	1,1	1,515	2 (100)	1,9	0,589	1 (50)	2,1	2 (100)	1,9
	p Nx [n (%)]	3 (4)	2 (67)	0,9	1,023	2 (67)	0,5	0,707	2 (67)	1,3	1 (33)	1,0
M- Kategorie	p M0 [n (%)]	39 (47)	38 (97)	1,1	0,797	28 (72)	1,3	1,043	31 (79)	1,3	25 (64)	1,5
	p M1 [n (%)]	11 (13)	11 (100)	1,3	1,064	8 (73)	1,2	1,243	9 (82)	1,7	6 (55)	1,7
	p Mx [n (%)]	33 (40)	32 (97)	1,3	0,959	30 (91)	1,5	1,052	26 (79)	1,6	24 (73)	1,9
Differen- zierung	G1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,9	0,815	3 (100)	1,8	1,347	2 (67)	1,3	3 (100)	1,8
	G2 [n (%)]	74 (89)	72 (94)	1,2	0,885	57 (77)	1,4	1,064	57 (77)	1,5	46 (62)	1,7
	G3 [n (%)]	6 (7)	6 (100)	1,8	0,966	6 (100)	1,0	0,957	6 (100)	2,0	5 (83)	1,2
UICC- Stadium	St. I [n (%)]	14 (17)	12 (86)	0,9	0,883	11 (79)	1,3	1,14	7 (50)	1,5	9 (64)	1,6
	St. II a [n (%)]	30 (36)	29 (97)	1,2	0,869	24 (80)	1,4	1,028	25 (83)	1,3	20 (67)	1,7
	St. II b [n (%)]	3 (4)	3 (100)	2,1	0,192	3 (100)	1,2	0,694	3 (100)	2,1	3 (100)	1,2
	St. III a [n (%)]	3 (4)	3 (100)	1,1	1,125	3 (100)	0,1	0,192	2 (67)	1,7	1 (33)	0,3
	St. III b [n (%)]	12 (14)	12 (100)	1,3	0,971	10 (83)	1,8	1,111	9 (75)	1,7	9 (75)	2,0
	St. III c [n (%)]	9 (11)	9 (100)	1,2	0,761	5 (56)	1,6	1,109	8 (89)	1,4	4 (44)	2,1
	St. IV [n (%)]	12 (14)	12 (100)	1,3	1,045	9 (75)	1,3	1,166	10 (83)	1,7	7 (58)	1,6
Vergleich Tumor/Nichttumor		Anzahl der Paare Tumor/ Nichttumor: 66		Mittelwerte: Tumor: 1,25 Nichttumor: 1,37			Standardabweichung: Tumor: 0,9 Nichttumor: 1,07			Signifikanz p: 0.482		

3.10 Expression von PAC 1

(siehe Tabelle 18)

Eine positive Immunreaktion konnte für PAC 1 im Tumorgewebe in 74 von 79 (93,7%) untersuchten Proben nachgewiesen werden. Im gesunden Kolongewebe war dies in 55 von 65 (84,6%) Fällen möglich.

3.10.1 Verteilung im Gewebe

PAC 1 fand sich sowohl in den entnommenen Proben des Tumors, als auch in den Proben des gesunden Gewebes fast ausschließlich im Zytosol der Zellen.

3.10.2 Grad der Expression

Die durchschnittliche Bewertung der Immunreaktion lag im Tumorgewebe bei 1,38. Im gesunden Gewebe konnte sie mit 1,18 angegeben werden.

3.10.3 Statistik

Bis auf einen Patienten gelang bei allen anderen 82 Patienten die Immunreaktion des Tumorgewebes. Bei 65 Patienten gelang dies auch im gesunden Darmgewebe. Insgesamt kamen so 65 Paarungen von Tumor/Nichttumor von jeweils einem Patienten zusammen. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression gefunden werden ($p=0,111$). Allerdings ließ sich ein signifikanter Unterschied bei der Expression in verschiedenen Tumorstadien nachweisen. So war PAC 1 bei T3/4 Tumoren signifikant stärker exprimiert, als bei den T1/2 Tumoren ($p=0,05$). Signifikante Korrelationen des Lymphknoten- oder Fernmetastasenstaus konnten nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 17: Expression von PAC 1

Anzahl Patienten Alter [Durchschnitt ± Standard- abweichung]		83 65,96 ±12,15	PAC 1									
			Alle Fälle Tumor			Alle Fälle Nichttumor			Positive Fälle Tumor		Positive Fälle Nichttu- mor	
Stadium		Gesamtzahl	Anzahl	Mittel- wert	SD	Anzahl	Mittel- wert	SD	Anzahl	Mittel- wert	Anzahl	Mittel- wert
T- Kategorie	p T1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,3	0,289	3 (100)	0,4	0,382	2 (67)	0,5	2 (67)	0,6
	p T2 [n (%)]	13 (16)	12 (92)	1,1	0,709	10 (77)	0,9	0,773	11 (85)	1,2	9 (69)	1,0
	p T3 [n (%)]	56 (67)	53 (95)	1,4	0,849	42 (75)	1,3	0,853	52 (93)	1,5	37 (66)	1,5
	p T4 [n (%)]	10 (12)	10 (100)	1,6	1,225	9 (90)	1,1	1,083	8 (80)	2,0	6 (60)	1,7
	p Tx [n (%)]	1 (1)	1 (100)	1,0	-	1 (100)	1,2	-	1 (100)	1,0	1 (100)	1,2
N- Kategorie	p N0 [n (%)]	44 (53)	42 (95)	1,3	0,864	34 (77)	1,1	0,792	39 (89)	1,4	30 (68)	1,3
	p N1 [n (%)]	18 (22)	17 (94)	1,4	1,01	15 (83)	1,1	0,879	16 (89)	1,4	12 (67)	1,3
	p N2 [n (%)]	16 (19)	16 (100)	1,6	0,902	11 (69)	1,4	1,205	15 (94)	1,7	8 (50)	1,9
	p N3 [n (%)]	2 (2)	2 (100)	1,0	0,412	2 (100)	1,9	0,141	2 (100)	1,0	2 (100)	1,9
	p Nx [n (%)]	3 (5)	2 (67)	1,9	0,904	3 (100)	0,8	0,289	2 (67)	1,9	3 (100)	0,8
M- Kategorie	p M0 [n (%)]	39 (47)	38 (97)	1,0	0,714	27 (69)	1,1	0,845	30 (77)	1,1	22 (56)	1,4
	p M1 [n (%)]	11 (13)	11 (100)	1,5	0,903	10 (91)	1,1	1,245	10 (91)	1,6	6 (55)	1,9
	p Mx [n (%)]	33 (40)	30 (91)	1,7	0,959	28 (85)	1,3	0,76	29 (88)	1,8	27 (82)	1,3
Differen- zierung	G1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	1,7	1,528	3 (100)	1,3	0,775	2 (67)	2,5	3 (100)	1,3
	G2 [n (%)]	74 (89)	70 (95)	1,3	0,867	56 (76)	1,2	0,85	67 (92)	1,4	48 (65)	1,3
	G3 [n (%)]	6 (7)	6 (100)	1,4	1,002	6 (100)	1,3	1,211	5 (83)	1,6	4 (67)	2,0
UICC- Stadium	St. I [n (%)]	14 (17)	12 (86)	1,0	0,786	10 (71)	0,8	0,807	10 (71)	1,2	8 (57)	1,1
	St. II a [n (%)]	30 (36)	28 (93)	1,4	0,826	23 (77)	1,2	0,799	27 (90)	1,4	21 (70)	1,3
	St. II b [n (%)]	3 (4)	3 (100)	1,9	1,465	3 (100)	1,2	0,289	3 (100)	1,9	3 (100)	1,2
	St. III a [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,8	0,25	3 (100)	0,5	0	3 (100)	0,8	3 (100)	0,5
	St. III b [n (%)]	12 (14)	11 (92)	1,7	1,035	9 (75)	1,6	0,768	11 (92)	1,7	8 (67)	1,8
	St. III c [n (%)]	9 (11)	9 (100)	1,4	0,978	5 (56)	1,3	1,109	8 (89)	1,5	4 (44)	1,6
	St. IV [n (%)]	12 (14)	12 (100)	1,4	0,886	11 (92)	1,2	1,211	11 (92)	1,5	7 (58)	1,9
Vergleich Tumor/Nichttumor		Anzahl der Paare Tumor/ Nichttumor: 65		Mittelwerte: Tumor: 1,38 Nichttumor: 1,18			Standardabweichung: Tumor: 0,94 Nichttumor: 0,89			Signifikanz p: 0,111		

3.11 Expression von VPAC 1

(Siehe Tabelle 18)

In 44 von 70 (62,9 %) Proben des untersuchten Tumorgewebes konnte eine positive Immunreaktion nachgewiesen werden, im gesunden Kolongewebe war dies in 42 von 62 (67,7%) Fällen möglich.

3.11.1 Verteilung im Gewebe

Sowohl in Zellen des Tumors, als auch in Zellen der gesunden Darmmukosa fand sich VPAC 1 fast ausschließlich im Zytosol.

3.11.2 Grad der Expression

Im Mittel betrug der Grad der Expression im Tumorgewebe 0,63. Die Färbung in der gesunden Darmmukosa lag durchschnittlich bei 0,71.

3.11.3 Statistik

Bei 70 von den 83 Patienten konnte die Immunhistochemie bewertet werden. In 62 der Fälle war dies auch im gesunden Gewebe möglich. Insgesamt ergaben sich 57 Paarungen aus Tumor/ Nichttumor. Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der Stärke der VPAC 1-Expression ($p=0,826$). Eine Korrelation mit Tumor-, Lymphknoten oder Metastasenstadium konnte für VPAC 1 nicht festgestellt werden.

Tabelle 18: Expression von VPAC 1

Anzahl Patienten Alter [Durchschnitt ± Standard- abweichung]		83 65,96 ±12,15	VPAC 1									
			Alle Fälle Tumor			Alle Fälle Nichttumor			Positive Fälle Tumor		Positive Fälle Nichttu- mor	
Stadium		Gesamtzahl	Anzahl	Mittel- wert	SD	Anzahl	Mittel- wert	SD	Anzahl	Mittel- wert	Anzahl	Mittel- wert
T- Kategorie	p T1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	1,1	0,962	3 (100)	0,1	0,192	2 (67)	1,7	1 (33)	0,3
	p T2 [n (%)]	13 (16)	11 (85)	0,3	0,797	12 (92)	0,6	0,71	5 (38)	1,0	8 (62)	1,0
	p T3 [n (%)]	56 (67)	46 (82)	0,7	0,751	40 (71)	0,8	0,986	31 (55)	1,0	28 (50)	1,1
	p T4 [n (%)]	10 (12)	9 (90)	0,4	0,632	7 (70)	0,7	0,678	5 (50)	0,8	5 (50)	1,0
	p Tx [n (%)]	1 (1)	1 (100)	0,4	-	-	-	-	1 (100)	0,4	-	-
N- Kategorie	p N0 [n (%)]	44 (53)	36 (82)	0,7	0,866	34 (77)	0,8	0,873	24 (55)	1,1	25 (57)	1,1
	p N1 [n (%)]	18 (22)	15 (83)	0,6	0,599	14 (78)	0,9	1,172	11 (61)	0,8	9 (50)	1,4
	p N2 [n (%)]	16 (19)	16 (100)	0,5	0,634	9 (56)	0,2	0,376	5 (31)	0,9	4 (25)	0,5
	p N3 [n (%)]	2 (2)	1 (50)	0,0	-	28 (100)	0,1	0,177	-	-	1 (50)	0,3
	p Nx [n (%)]	3 (4)	2 (67)	0,9	0,859	3 (100)	0,8	0,174	3 (100)	0,9	3 (100)	0,8
M- Kategorie	p M0 [n (%)]	39 (47)	32 (82)	0,4	0,562	27 (69)	0,7	0,964	17 (44)	0,8	18 (46)	1,1
	p M1 [n (%)]	11 (13)	11 (100)	0,5	0,702	8 (73)	0,2	0,351	5 (45)	0,9	3 (27)	0,6
	p Mx [n (%)]	33 (40)	27 (82)	0,9	0,9	27 (82)	0,8	0,882	22 (67)	1,3	21 (64)	1,1
Differen- zierung	G1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	1,0	1,732	3 (100)	0,5	0,397	1 (33)	3	2 (67)	0,7
	G2 [n (%)]	74 (89)	62 (84)	0,6	0,69	53 (72)	0,8	0,921	39 (53)	0,9	39 (53)	1,1
	G3 [n (%)]	6 (7)	5 (83)	0,7	0,935	6 (100)	0,1	0,204	4 (67)	1,1	1 (17)	0,5
UICC- Stadium	St. I [n (%)]	14 (17)	11 (79)	0,4	0,889	12 (86)	0,6	0,71	5 (36)	1,2	8 (57)	1,0
	St. II a [n (%)]	30 (36)	24b(80)	0,8	0,866	23 (77)	0,8	0,901	18 (60)	1,1	18 (60)	1,1
	St. II b [n (%)]	3 (4)	2 (67)	1,0	0,739	2 (67)	1,3	0,943	3 (100)	1,0	2 (67)	1,3
	St. III a [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,8	0,839	3 (100)	0,1	0,192	2 (67)	1,2	1 (33)	0,3
	St. III b [n (%)]	12 (14)	9 (75)	0,5	0,517	8 (67)	1,4	1,328	7 (58)	0,7	7 (58)	1,6
	St. III c [n (%)]	9 (11)	9 (100)	0,5	0,574	5 (56)	0,3	0,415	2 (22)	1,0	3 (33)	0,5
	St. IV [n (%)]	12 (14)	11 (92)	0,5	0,702	9 (75)	0,2	0,336	6 (50)	0,9	3 (25)	0,6
Vergleich Tumor/Nichttumor		Anzahl der Paare Tumor/ Nichttumor: 57		Mittelwerte: Tumor: 0,63 Nichttumor: 0,71			Standardabweichung: Tumor: 0,79 Nichttumor: 0,91			Signifikanz p: 0,826		

3.12 Expression von VPAC 2

(Siehe Tabelle 19)

Für VPAC 2 konnte insgesamt in 64 von 80 (80%) Fällen im Tumorgewebe eine positive Immunreaktion nachgewiesen werden. Im nicht erkrankten Gewebe war die Immunreaktion in 64 von 71 (90,1%) Fällen positiv.

3.12.1 Verteilung im Gewebe

VPAC 2 fand sich sowohl in den Epithelzellen des Tumors, als auch in den Epithelzellen im gesunden Gewebe im gesamten Zytosol lokalisiert.

3.12.2 Grad der Expression

Im Tumorgewebe lag die durchschnittliche Intensität der immunhistochemischen Färbung bei 0,94. In den Proben der nichtneoplastischen Darmmukosa hingegen konnte die durchschnittliche Intensität mit 1,74 angegeben werden.

3.12.3 Statistik

Insgesamt gelang der Immunreaktionsnachweis bei Tumorproben von 80 Patienten. Bei 66 Patienten war dies auch bei Proben der normalen Darmmukosa der Fall. So ergaben sich 65 Paare aus Tumor/ Nichttumorgewebe von jeweils einem Patienten. Die Unterschiede zwischen der durchschnittlichen Bewertungen von beiden Gewebeproben waren signifikant ($p < 0.0001$), VPAC 2 ist in Tumorzellen im Vergleich zu gesunden Zellen vermindert exprimiert.

Eine signifikante Mehr- oder Minderexpression beim Vergleich der Tumorstadien konnte nicht gezeigt werden. Lymphknotenstatus und Metastasenstaus zeigten ebenfalls keine signifikante Mehr- oder Minderexpression.

Abbildung 7: VPAC 2, Nichttumor, Vergrößerung x 400



Abbildung 8: VPAC 2, Tumor, Vergrößerung x 400

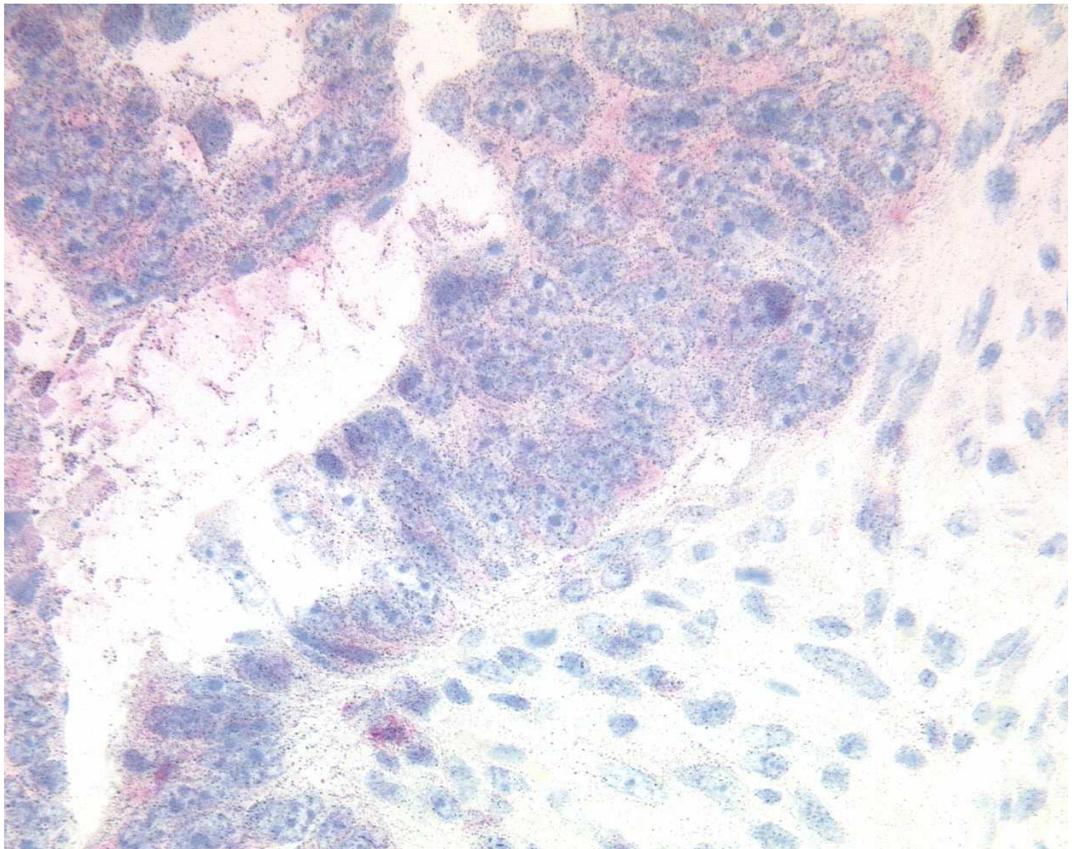


Tabelle 19: Expression von VPAC 2

Anzahl Patienten Alter [Durchschnitt ± Standard- abweichung]		83 65,96 ±12,15	VPAC 2									
Stadium		Gesamtzahl	Alle Fälle Tumor			Alle Fälle Nichttumor			Positive Fälle Tumor		Positive Fälle Nichttumor	
			Anzahl	Mittelwert	SD	Anzahl	Mittelwert	SD	Anzahl	Mittelwert	Anzahl	Mittelwert
T-Kategorie	p T1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,3	0,102	3 (100)	0,8	0,764	3 (100)	0,3	2 (67)	1,3
	p T2 [n (%)]	13 (16)	12 (92)	0,7	0,874	11 (85)	1,8	0,811	7 (54)	1,2	11 (85)	1,8
	p T3 [n (%)]	56 (67)	54 (96)	1,2	0,972	43 (77)	1,8	0,846	44 (79)	1,5	43 (77)	1,8
	p T4 [n (%)]	10 (12)	10 (100)	0,8	0,762	8 (80)	1,3	0,9	9 (90)	0,8	7 (70)	1,5
	p Tx [n (%)]	1 (1)	1 (100)	3,0	-	1 (100)	3,0	-	1 (100)	3	1 (100)	3
N-Kategorie	p N0 [n (%)]	44 (53)	43 (98)	0,9	0,976	36 (82)	1,5	0,933	34 (77)	1,4	35 (80)	1,8
	p N1 [n (%)]	18 (22)	17 (94)	0,6	0,648	15 (83)	1,7	0,689	14 (77)	0,8	15 (83)	1,7
	p N2 [n (%)]	16 (19)	16 (100)	1,4	1,087	10 (63)	1,3	0,871	14 (88)	1,6	10 (63)	1,3
	p N3 [n (%)]	2 (2)	2 (100)	0,6	0,909	2 (100)	2	1,414	1 (50)	1,3	2 (100)	2,0
	p Nx [n (%)]	3 (4)	2 (67)	1,9	0,793	3 (100)	1,9	0,804	3 (60)	1,9	3 (60)	1,9
M-Kategorie	p M0 [n (%)]	39 (47)	37 (95)	0,9	0,984	27 (69)	1,3	0,841	30 (77)	1,4	27 (69)	1,6
	p M1 [n (%)]	11 (13)	11 (100)	0,9	0,86	9 (82)	1,3	0,711	10 (83)	1,1	9 (75)	1,3
	p Mx [n (%)]	33 (40)	32 (97)	1,1	0,979	30 (91)	2,0	0,887	25 (76)	1,4	29 (88)	2,0
Differenzierung	G1 [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,6	0,459	3 (100)	2,1	0,674	3 (100)	0,6	3 (100)	2,1
	G2 [n (%)]	74 (89)	71 (96)	1,1	0,975	57 (77)	1,7	0,835	56 (76)	1,3	55 (74)	1,8
	G3 [n (%)]	6 (7)	6 (100)	1,3	0,99	6 (100)	1,5	1,305	6 (86)	1,6	6 (86)	1,5
UICC-Stadium	St. I [n (%)]	14 (17)	12 (86)	0,7	0,855	12 (86)	1,6	0,929	8 (57)	1,1	11 (85)	1,8
	St. II a [n (%)]	30 (36)	29 (97)	1,2	0,974	23 (77)	1,9	0,846	24 (80)	1,5	23 (77)	1,9
	St. II b [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,7	0,667	3 (100)	1,2	1,258	2 (67)	1,0	2 (67)	1,8
	St. III a [n (%)]	3 (4)	3 (100)	0,2	0,173	2 (67)	1,5	0,707	2 (67)	0,3	2 (67)	1,5
	St. III b [n (%)]	12 (14)	11 (92)	0,8	0,754	10 (83)	1,8	0,733	9 (75)	1,0	10 (83)	1,8
	St. III c [n (%)]	9 (11)	9 (100)	1,7	1,134	5 (56)	1,5	0,969	8 (89)	1,9	5 (56)	1,5
	St. IV [n (%)]	12 (14)	12 (100)	1,0	0,83	10 (83)	1,4	0,868	11 (92)	1,1	10 (77)	1,4
Vergleich Tumor/Nichttumor		Anzahl der Paare Tumor/ Nichttumor :		Mittelwerte:			Standardabweichung:			Signifikanz p:		
		65		Tumor: 0,94 Nichttumor: 1,74			Tumor: 0,87 Nichttumor : 0,87			p<0,0001		

4. Diskussion

4.1 BRS 3, CCKA, CXCR 4, GHRH, GRPR, NK 1, NMBR, NT 2, PAC 1, VPAC 1 und VPAC 2 bei Tumorerkrankungen

4.1.1 Bombesin-ähnliche Rezeptoren in malignen Erkrankungen

Bombesin like peptides verfügen in kleinzelligen Bronchialkarzinomen und neuroendokrinen Tumoren über mitogen aktivierende Proteinkinasen und führen zur verstärkten Expression von Onkogenen und Wachstumsfaktoren (Moody et al. 2003).

4.1.1.1 GRPR

GRPR Promoter-Regionen konnten unter anderem in Brust- und Duodenalkarzinomen nachgewiesen werden (Xiao et al. 2000). Auch in Zellreihen von kleinzelligen Bronchialkarzinomen fand sich GRPR, wo er wahrscheinlich als autokriner Wachstumsfaktor fungiert (Corjay et al. 1991). Auch an der autokrinen Regulation des HNSCC konnte eine Beteiligung von GRP und GRPR nachgewiesen werden (Lango et al. 2002). Weitere Zelllinien, in denen eine erhöhte Expression von GRPR gezeigt werden konnte, sind Zelllinien des duktales Pankreaskarzinoms und des Prostatakarzinoms (Szepeshazi et al. 2005, Daaka et al. 2004, Bartholdi et al. 1998).

Scott et al. (2004) untersuchten ebenfalls mittels Immunhistochemie GRP und GRPR bzw. deren Expression, allerdings in Karzinoiden des Magens, Dünndarms, der Appendix sowie des Kolorektums. GRP konnte in 19 Tumoren, und GRPR in 22 von 26 untersuchten Tumoren nachgewiesen werden. GRPR zeigte vor allem in Karzinoiden des Appendix eine starke Expression. Eine vergleichende Untersuchung der Expression von GRPR in gesundem Gewebe von Appendix, Magen, Dünndarm oder kolorektalen Gewebes wurde nicht durchgeführt. In der Arbeit von Scott et al. (2004) wird die stärkste Intensität der Färbung im Zytosol beschrieben. Diese Aussage kann in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Hier war GRPR deutlich membranär nachweisbar. In einer meiner Arbeit sehr ähnlichen Studie untersuchten Kollegen aus Brasilien Tumor- und gesundes Kontrollgewebe immunhistochemisch auf die Expression von GRPR, allerdings in

Zervixkarzinomen. In 99% der untersuchten Tumorproben ließ sich GRPR nachweisen. Eine Korrelation zwischen der GRPR-Expression und der Invasivität der Tumoren konnte nicht gezeigt werden (Cornelio et al 2007).

Chave et al.(2000) untersuchten mittels reverser Transkriptase-PCR kolorektale Adenokarzinome von 23 Patienten auf GPCR-mRNA. Ebenfalls untersucht wurden Proben aus gesundem Dickdarmgewebe der gleichen 23 Patienten. In 16 von 23 untersuchten Paaren Tumor/nichtneoplastische Darmmukosa konnte eine signifikant höhere Expression von GRPR-mRNA im Tumorgewebe nachgewiesen werden. Allerdings bedeutet diese Aussage noch nicht zwingend, daß der Rezeptor tatsächlich vermehrt auf Proteinebene exprimiert wird.

Wie auch in der hier vorliegenden Arbeit geschehen, untersuchten Chave et al. (2000) den Grad der Expression von GRPR mit dem Grad der Differenzierung des Karzinoms auf eine Korrelation. Beide Arbeiten konnten keine Korrelation nachweisen, was sicherlich auch an der in beiden Arbeiten niedrigen Fallzahl liegen kann.

Auch in der vorliegenden Arbeit konnte GRPR im Kolonkarzinom sowie in gesundem Kolongewebe nachgewiesen werden. In 22 von 79 (27,8%) Fällen konnte im Tumorgewebe GRPR nachgewiesen werden, im gesunden Kolonepithel war dies in 15 von 69 (21,7%) Fällen möglich.

Eine Korrelation mit Tumorstadium und Lymphknoten- oder Fernmetastasenstatus fehlte. Des Weiteren konnte auch keine signifikante Hoch- oder Runterregulierung im Vergleich zur gesunden Mukosa gefunden werden.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit aber eine erhöhte Expression von GRPR in Kolonkarzinom nachgewiesen werden. Das die Ergebnisse im Vergleich zu Chave et al. nicht signifikant sind, mag an der unterschiedlichen Nachweismethode liegen. Des Weiteren sind die Fallzahlen von Chave et al. (2000) sehr gering, so das die Aussagekraft ihrer Ergebnisse deutlich eingeschränkt ist.

4.1.1.2 BRS 3

Obwohl BRS 3 zu den sogenannten Orphan-Rezeptoren gehört, man also noch keinen Liganden für BRS 3 gefunden hat, konnte man doch eindeutig nachweisen, daß BRS 3 mit malignen Erkrankungen in Zusammenhang steht. Vor allem Tumoren der Lunge stehen dabei im Vordergrund.

BRS 3 ist ähnlich wie GRPR eng mit dem kleinzelligen Bronchialkarzinom assoziiert, er findet sich aber auch in allen anderen histologischen Typen des Bronchialkarzinoms (Fathi et al. 1992). Des Weiteren konnte BRS-3 auch in Nierenzellkarzinomen, Ovarial- und Pankreaskarzinomen sowie in Prostatakarzinomen nachgewiesen werden (Reubi et al. 2002, Sun et al. 2000, Schulz et al. 2006).

Eine Expression von BRS-3 konnte bis jetzt zwar in neuronalen Zellen des Gastrointestinaltraktes gezeigt werden (Porcher et al. 2005, Chave et al. 2000), aber ein Nachweis von BRS-3 in Epithelzellen des Kolons oder in kolorektalen Karzinomen stand noch aus.

Die vorliegende Arbeit konnte erstmals zeigen, daß BRS 3 auch in Kolonkarzinomen verstärkt exprimiert wird. Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnitte konnte zweifelsfrei eine verstärkte Expression in neoplastisch verändertem Darmgewebe belegen. Im Tumorgewebe wurde die Intensität der Färbung im Mittel mit 0,76 angegeben, während diese in Schnitten gesunden Gewebes lediglich bei 0,42 lag. Insgesamt konnte BRS 3 im Tumor in 76,3% der Fälle nachgewiesen werden, in gesundem Gewebe nur in 46,9% der Fälle.

Diese Erkenntnisse legen eine pathophysiologische Relevanz nahe. Ob und in wie weit BRS 3 für die Diagnostik oder Therapie des kolorektalen Karzinoms eingesetzt werden könnte, müssen weitere Studien klären. Des Weiteren wäre interessant, ob ein Nachweis der Korrelation mit Tumor-, Lymphknoten oder Metastasenstadium in Studien mit einer größeren Fallzahl gelingt.

4.1.1.3 NMBR

NMBR findet sich, wie auch die anderen untersuchen BLR, im kleinzelligen Bronchialkarzinom (Cuttitta et al. 1985).

In einer groß angelegten Studie über BLR in Prostatakarzinomen von Bartholdi et al. aus dem Jahr 1998 konnten NMBR und GRPR mittels RT-PCR in malignen Zellen der Prostata nachgewiesen werden. Wobei GRPR deutlich stärker exprimiert zu sein schien als NMBR. Ein Nachweis von BRS 3 gelang leider nicht.

Des Weiteren wurde für NMBR eine Koexpression mit proliferierenden Zellen sowohl in gesundem wie auch in maligne entartetem Kolonepithel nachgewiesen. So untersuchten Matusiak et al. 2005 ebenfalls nichtmaligne und maligne Zellreihen (nichtmaligne: NCM 460 und maligne Caco 2 und HAT-29). Monoklonale Anti-NMBR-Antikörper, die an das COOH-Ende des Rezeptors binden, wurden hergestellt und zur Immunhistochemie verwendet. NMBR war in malignen Zellen der untersuchten Zellreihen im Tumor signifikant stärker exprimiert als im gesunden Kolongewebe. Zusätzlich zeigte sich eine positive Korrelation mit dem Differenzierungsgrad, höher differenzierte Tumorgewebe zeigten eine stärkere Expression.

Auch in der vorliegenden Arbeit gelang es eine erhöhte Expression von NMBR in Kolonkarzinomen nachzuweisen. Insgesamt konnte NMBR in 86,6% der Fälle im Kolonkarzinom nachgewiesen werden, im gesunden Gewebe in 83,3% der Fälle. Der Mittelwert der Farbtintensität lag mit 1,2 im Tumorgewebe höher als im gesunden Kolongewebe, wo der Mittelwert 0,96 betrug. Dieser Unterschied zwischen neoplastischem und nichtneoplastischem Gewebe reichte aus, um NMBR als grenzwertig signifikant hochreguliert im Tumor einzustufen. Eine Korrelation zum Differenzierungsgrad wie bei Matusiak et al. (2005) konnte nicht nachgewiesen werden. Dies könnte unter anderem an der Beschränkung auf nur drei Zelllinien in der Arbeit von Matusiak et al. gelegen haben. Des Weiteren wird in der Arbeit von Matusiak et al. nicht auf die von ihnen verwendete Fallzahl eingegangen, was die Vergleichbarkeit der vorliegenden Arbeit mit der von Matusiak et al. deutlich einschränkt. Auch die Benutzung von Matusiak et al. ebenfalls nicht kommerzieller Antikörper erschwert den Vergleich. Aber gerade daß die beiden Arbeiten trotz der unterschiedlichen Antikörper zu ähnlichen Ergebnissen kommen, legt den Schluss nahe, daß NMBR im Kolonkarzinom eine pathophysiologische Relevanz zu kommt.

4.1.2 Chemokin-Rezeptoren bei Tumorerkrankungen

Insgesamt scheinen G-protein gekoppelte Chemokinrezeptoren eine wichtige Rolle bei der Metastasierung von Tumoren zu spielen. Viele Tumoren metastasieren bevorzugt in Organe, die man nicht als erstes erwarten würde. Folgt man dem Blutabfluss aus dem Tumorgebiet, müssten eigentlich andere Organe bevorzugt werden. Diese organspezifische Metastasierung hängt zum Teil an der Interaktion zwischen den Chemokinrezeptoren der Tumorzellen und dem Chemokingradienten in den Zielorganen zusammen (Balkwill et al. 2004a). Viele Tumoren in denen CXCR 4 gefunden wird, metastasieren in Gewebe die CXCL12 exprimieren (Balkwill 2004b).

Für CXCR 4 und dessen Liganden CXCL12 konnte bereits immunhistochemisch eine signifikant erhöhte Expression in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus nachgewiesen werden (Saski et al. 2009). Des Weiteren weiß man, daß CXCL12 über eine Förderung der Tumorzellmigration eine Rolle bei der Metastasierung des hepatozellulären Karzinoms spielt (Liu et al. 2008).

Zu den weiteren Tumoren, in deren Zellen eine erhöhte Expression von CXCR 4 nachgewiesen werden kann, zählt das Mammakarzinom. Hier kann wahrscheinlich auch der oben beschriebene Metastasierungsweg angenommen werden. CXCL12 fand sich deutlich hochreguliert in den regionären Lymphknoten der erkrankten Patientinnen (Müller et al. 2001).

Auch für das HNSCC zeigt sich, daß CXCR 4 stark mit der Metastasenbildung in Zusammenhang steht. Es konnte gezeigt werden, daß bei HNSCC mit erhöhter CXCR 4-Expression nicht nur eine signifikante Verbindung zu Lymphknotenmetastasen besteht, sondern auch ein Zusammenhang mit dem Grad der Invasion des Tumors, mit der Rezidivwahrscheinlichkeit und damit auch mit der Prognose (Almofti et al. 2004).

Auch die Proliferation der malignen Zellen im kleinzelligen Bronchialkarzinom ist stark mit der CXCR 4-Expression assoziiert. Es konnte nachgewiesen werden, daß CXCL12 direkt das Wachstum von CXCR 4 positiven Geweben stimuliert. Des Weiteren konnte für CXCL12 auch eine steigernde Wirkung auf die Motilität und auf die Adhäsion der maligne entarteten Zellen gezeigt werden. Außerdem ließ sich ein Effekt auf die Zellmorphologie beobachten. Die malignen Zellen zeigten eine verstärkte Bildung von Filopodien und Neuriten-ähnlichen Ansätzen (Kijima et al. 2002).

Das nicht kleinzellige Bronchialkarzinom gehört ebenfalls zu den CXCR 4-exprimierenden Tumoren. Auch hier konnte ein Zusammenhang mit der Metastasierung nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte hier auch ein Zusammenhang mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) nachgewiesen werden. EGF kann die CXCR 4-Expression steigern und somit auch die Fähigkeit zur Zellmigration (Phillips et al. 2005).

Jordan et al. (1999) wiesen CXCR 4 mittels Durchflußzytometrie auf der Oberfläche von HT-29 Kolonepithelzellen nach. In etwa der Hälfte der untersuchten HT-29 Zellreihen fand sich CXCR 4 an der Oberfläche der Kolonepithelialzellen. Auch in immunhistochemischen Untersuchung an Biopsien aus entzündetem sowie nichtentzündetem Kolonepithel ließ sich CXCR 4 nachweisen (Jordan et al. 1999). Eine Aussage über die Lokalisation in der Zelle wurde dabei allerdings nicht gemacht.

Ein Nachweis von CXCR 4 in kolorektalen Karzinomen konnte in der einschlägigen Literatur nicht gefunden werden.

Die vorliegende Arbeit erbrachte nun erstmals den Nachweis von CXCR 4 auch in kolorektalen Karzinomen. CXCR 4 ließ sich immunhistochemisch in maligne entarteten Zellen des Kolons nachweisen. Als Bestätigung der Ergebnisse von Jordan et al. ist auch in dieser Arbeit CXCR 4 in gesundem Gewebe nachweisbar. Die Intensität der immunhistochemischen Färbung war allerdings deutlich geringer ausgeprägt, als dies in neoplastischem Gewebe der Fall war. CXCR 4 ist also im Kolonkarzinom im Vergleich zu gesundem Gewebe deutlich hochreguliert. In der von mir durchgeführten immunhistochemischen Untersuchung zeigte sich CXCR 4 sowohl in gesundem, als auch in neoplastisch verändertem Gewebe vor allem im Zytosol lokalisiert. Jordan et al. berichten aber in der Durchflusszytometrie nur von einer Lokalisierung auf der Oberfläche der Zellen. Auf die Lokalisierung in der Zelle, vor allem in der immunhistochemischen Untersuchung wird leider nicht eingegangen, was sicherlich auch methodisch bedingt ist, denn die Durchflusszytometrie erlaubt keinen Nachweis von intrazellulären Antigenen.

Eine signifikante Korrelation mit Fernmetastasen- und Lymphknotenstatus, sowie mit dem Differenzierungsgrad konnte nicht nachgewiesen werden. Das liegt sicherlich an der nur geringen Fallzahl. Die Untersuchung eines größeren Fallkollektivs ist zu empfehlen.

4.1.3 Tachykininrezeptoren bei Tumorerkrankungen

4.1.3.1 NK 1

2001 versuchten Petit et al. (2001) mittels RT-PCR und radioaktiv markierten Liganden in einer ausgewählten Zelllinie (HT-29) von Kolonkarzinomen NK 1-Rezeptoren nachzuweisen, was damals allerdings noch nicht gelang.

Sieben Jahre später wiesen Rosso et al. (2008) erstmals NK 1 in Zellreihen von Adenokarzinomen des Kolons, als auch in Zellreihen von Magenkarzinomen nach. Ihnen gelang der Nachweis mittels Immunoblot. Außerdem konnte gezeigt werden, daß der Ligand von NK 1, Substanz P als direktes Mitogen in den untersuchten Zellreihen fungierte. Bei Zugabe von nanomolekularen Mengen von Substanz P zu den Zellreihen der untersuchten Karzinome, zeigte sich ein signifikantes Wachstum der Zellreihen. Im Gegenzug wurde die Einleitung der Apoptose dieser Zellreihen beobachtet, als man Rezeptorantagonisten von NK 1 applizierte.

Die vorliegende Arbeit bestätigt die Ergebnisse von Rosso et al. (2008). NK 1 konnte hier in fast allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Die Intensität der immunhistochemischen Reaktion betrug im Mittel für NK 1 in Tumorgewebe 2,37 und im gesunden Kolongewebe 2,12 und eine positive Immunreaktion konnte für NK 1 im Tumorgewebe in 100% der untersuchten Proben nachgewiesen werden. Im gesunden Kolongewebe war dies immerhin noch in 95,6% der Fälle möglich. Eine Korrelation mit Tumorinvasivität oder Metastasierungsgrad konnte nicht nachgewiesen werden. Allerdings sind die Fallzahlen in der vorliegenden Arbeit sicherlich zu gering, um zu einem aussagekräftigen Ergebnis zu kommen.

4.1.4 Neurotensinrezeptoren bei Tumorerkrankungen

Tasuta et al. (1990) untersuchten die Wirkungen von Neurotensin auf mit Azoxymethan (AOM) behandelte Ratten. AOM induziert bei Ratten kolorektale Karzinome. Nach Neurotensinapplikation kam es zu einem signifikanten Anstieg der

Anzahl, Größe und Invasivität der kolorektalen Karzinome im Vergleich zu nicht mit Neurotensin, sondern nur mit AOM behandelten Ratten. Tasuta et al. (1990) kamen damals zu dem Schluß, daß Neurotensin wahrscheinlich an der Proliferation von Zellen in Kolonkarzinomen beteiligt ist.

Gui et al. (2008) konnten ebenfalls den Rezeptor nachweisen. Vor allem Neurotensinrezeptor Subtyp 1 (NT 1) wird von Adenokarzinomen des Kolons exprimiert.

Dong et al. (2000) untersuchten Kolonkarzinome auf Expression des Neurotensin/Neuromedin N-Gens, allerdings nur in den Zelllinie KM12C und KM20. Sie konnten zeigen, daß das Neurotensin/Neuromedin N-Gen ausschließlich in der KM12C-Zellreihe exprimiert wird.

Evers et al. (1996) konnten schon früher zeigen, daß das von Dong et al. (2000) untersuchte Gen in 25% aller von ihnen untersuchten Kolonkarzinomzellreihen exprimiert wird. In Untersuchungen von gesundem Kolongewebe zeigte sich das Neurotensin/Neuromedin N-Gen im gesunden Darmgewebe von Neugeborenen und Erwachsenen unterdrückt. Lediglich in fetalem Kolongewebe wird das Neurotensin/Neuromedin N-Gen exprimiert.

In der hier vorliegenden Arbeit ist erstmalig der Nachweis von NT 2 in kolorektalen Karzinomen mittels Immunhistochemie gelungen. NT 2 wurde in 64 Fällen (79%) von 81 untersuchten Kolonkarzinomproben nachgewiesen. In gesundem Kolongewebe lag der Anteil bei 81% (54 von 66 Fällen). Bei höheren durchschnittlichen Bewertungen der Intensität war NT 2 in gesundem Gewebe, wenn auch nicht signifikant, aber dennoch stärker exprimiert als im neoplastisch veränderten Gewebe. Polak et al. (1977) konnten mittels Immunhistochemie noch keinen Nachweis von NT 2 in gesundem Kolon erbringen. Dies mag unter anderem auch an der inzwischen verbesserten Spezifität der Antikörper liegen.

4.1.5 Rezeptoren für VIP und PACAP bei Tumorerkrankungen

Reubi et al. (1995) wiesen einen Rezeptor für vasoaktives intestinales Peptid in verschiedenen Tumoren nach. Dafür wurden 339 Tumoren in vitro mittels Autoradiographie und radioaktivem ¹²⁵I-VIP untersucht, 21 der untersuchten Tu-

moren waren Adenokarzinome des Kolons. Damals wurde allerdings noch nicht zwischen VPAC 1 und VPAC 2 unterschieden, sondern nur von einem vasoaktiven intestinalen Peptid-Rezeptor (VIP-R) gesprochen. Zu den Tumoren bei denen eine VIP-R-Expression nachgewiesen werden konnte, gehören unter anderem Karzinome der Brust und deren Metastasen, Karzinome des Endometriums, Adenokarzinome des Ovars, Metastasen von Prostatakarzinomen, Blasenkarzinome, Adenokarzinome des Kolons, Adenokarzinome des Pankreas, gastrointestinale Plattenepithelkarzinome, nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, Lymphome, Astrozytome, Glioblastome sowie Meningeome.

Der von Reubi et al. (2000) untersuchte Rezeptor zeigte in allen untersuchten Tumoren eine hohe Affinität für seine Liganden und war spezifisch für VIP und PACAP. Insbesondere die untersuchten Kolonkarzinome waren alle rezeptorpositiv. Allerdings wurde keine Aussage über den Grad der Expression von VIP-R getroffen. Auch ob gesundes Kolongewebe rezeptorpositiv ist, bzw. ob es Unterschiede in der Rezeptorexpression von gesundem und neoplastisch verändertem Gewebe gibt, wurde nicht untersucht. Reubi et al. (2000) ergänzten ihre bisherigen Ergebnisse mit einer erneut groß angelegten Studie über die Expression von VIP/PACAP-Rezeptoren in gesunden und neoplastischen menschlichen Geweben mittels in vitro Autoradiographie. Diesmal wurde zwischen VPAC 1, VPAC 2 und PAC 1 unterschieden. Reubi et al. (2000) zeigten, dass VPAC 1 vor allem in gesunden Geweben von Leber, Brustdrüse, Niere, Prostata, Blase, Pankreas, gastrointestinaler Mukosa, Lunge, Schilddrüse und lymphatischem Gewebe vorkommt. Maligne Tumoren dieser Gewebe exprimierten dann auch VPAC 1.

VPAC 2 konnte in gesundem Gewebe vor allem in glatter Muskulatur und Blutgefäßen nachgewiesen werden. In malignen Tumoren konnte VPAC 2 nicht nachgewiesen werden. Nur Leiomyome zeigten eine VPAC 2-Expression. PAC 1 konnte in gesundem Gewebe im Mark der Nebenniere nachgewiesen werden. In malignen Tumoren zeigte sich eine Expression vorzugsweise in glialen Tumoren sowie Pragangliomen, Phäochromozytomen und Karzinomen des Endometriums. In dieser Studie wurde zwar verglichen, ob die jeweiligen Rezeptoren in den gleichen Geweben vorkommen, je nach dem ob es sich um gesundes oder neoplastisch verändertes Gewebe handelt. Eine Aussage über signifikante Unterschiede in der Expression wurde aber nicht getroffen. Des Weiteren wurden leider keine konkreten Fallzahlen angegeben. Insgesamt untersuchten Reubi et al. (2000) über

600 Tumoren und deren Metastasen, wie viele davon aber Kolonkarzinomen oder gesunder Kolonmukosa zuzuordnen waren, wurde nicht erwähnt. Bei der Vielzahl an verschiedenen Geweben, die untersucht wurden, ist aber davon auszugehen, daß die einzelnen Fallzahlen nicht sehr hoch gewesen sein können.

Die vorliegende Arbeit bestätigt diese Ergebnisse von Reubi et al. (2000) nur teilweise. Beide Arbeiten konnten zeigen, daß VPAC 1 in gesundem Kolongewebe sowie in kolorektalen Karzinomen vorkommen.

Zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen kommen beide Arbeiten in Bezug auf die Expression von VPAC 2. Die vorliegende Arbeit zeigt eine deutlich stärkere Expression von VPAC 2 sowohl im gesunden Kolon, als auch im Adenokarziom, als VPAC 1.

VPAC 2 zeigte sich nicht nur häufiger positiv (VPAC 2 im Tumor 80% rezeptorpositiv, im gesunden Gewebe 90,1% rezeptorpositiv, VPAC 1 im Tumor 62,9% rezeptorpositiv und im gesunden Gewebe 67,7% rezeptorpositiv) sondern im Schnitt auch stärker exprimiert als VPAC 1 (VPAC 2 Intensität der Färbung im Tumorgewebe 0,94, und im gesunden Kolon 1,74, VPAC 1 Intensität der Färbung im Tumorgewebe 0,63 und im gesunden Kolon 0,71). Eine Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse mag in den verschiedenen Techniken zum Nachweis der Rezeptoren liegen.

Des Weiteren konnte die vorliegende Arbeit zeigen, daß VPAC 2 in gesundem Gewebe signifikant stärker exprimiert wird, als im Adenokarzinom des Kolons.

Auch PAC 1, der von Reubi et al. (2000) im Kolon, bzw. im Adenokarzinom des Kolons nicht nachgewiesen wurde, konnte in meiner Arbeit eindeutig nachgewiesen werden. Das Tumorgewebe zeigte sich in 93,7% der Fälle rezeptorpositiv, das nicht neoplastisch veränderte Kolongewebe in 84,6% der Fälle. Zusätzlich konnte eine verstärkte Expression in höheren Tumorstadien gezeigt werden.

Weitere Arbeiten über PAC 1 oder VPAC 2 in Kolongewebe, die meine Ergebnisse untermauern würden, waren in der Literatur nicht zu finden.

4.1.6 Weitere G-protein gekoppelte Rezeptoren bei Tumorerkrankungen

Sowohl für CCKA-R als auch für CCKB-R konnte eine Rolle im Zellwachstum bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen nachgewiesen werden (Sethi et al. 1993).

Weinberg et al. (1997) wiesen mittels reverser Transkription und anschließender RT-PCR CCKA-R und CCKB-R in Zellen des duktales Pankreaskarzinoms nach.

Allerdings zeigten Reubi et al. (2000), daß beide CCK-Rezeptoren eher in Nervengewebe und Inselzellen, als in neoplastisch veränderten Zellen vorkommen.

Schulz et al. (2005) wiesen wiederum CCKA-R immunhistochemisch in Karzinoiden, Insulinomen, Hypophysenadenomen und Meningeomen nach. CCKA-R fand sich in den Plasmamembranen der Tumorzellen.

Petit et al. (2001) nutzten RT-PCR und radioaktiv markierte Liganden, um die Rezeptoren von Cholezystokinin, Neurotensin, Vasopressin, Tachykinin und Substanz P in 11 verschiedenen Tumorzelllinien nachzuweisen. Die Zelllinien stammten aus Astrozytomen, Lymphomen, Pankreas-, Bronchial- und Kolonkarzinomen. Allerdings gelang ein Nachweis weder von CCKA-R noch CCKB-R in der Zelllinie des Kolonkarzinoms. CCKB-R konnte in Zellreihen des Pankreas- (MiaPaCA-2), sowie in einer Zellreihe eines Bronchialkarzinoms (NCI-H69) nachgewiesen werden. CCKA-R konnte in allen drei Zellreihen der Pankreaskarzinome (MiaPaCA-2, RWP2 und PACN1), sowie in einer Zellreihe eines Prostatakarzinoms (LNCaP) und einer Bronchialkarzinomreihe (NCI-H69) nachgewiesen werden.

Imdahl et al (1995) versuchten CCKB-R per RNase-Protection-Assay in Geweben aus Kolonkarzinomen nachzuweisen. CCKB-R konnte nur in 11% der Fälle nachgewiesen werden. Zusätzlich fand sich in 75% der Fälle CCKC-R. CCKC-R gehört nicht zu den GPCR, sondern ist ein Enzym, das an der beta-Oxidation von Fettsäuren beteiligt ist (Baldwin et al. 1994). Imdahl et al. schlossen daraus, daß weniger CCKB-R als viel mehr CCKC-R an der Signaltransduktion bei der Proliferation von Kolonkarzinomen beteiligt ist.

Reubi et al. (1999) untersuchten mittels Rezeptor-Autoradiographie CCKA-R und CCKB-R in 25 Adenokarzinomen des Kolons. CCKA-R konnte in keinem der 25 Fälle, und CCKB-R in 1 von 25 Fällen nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse widersprechen denen der vorliegenden Arbeit. Ich konnte CCKA-R in 75,6% (59 von 78 untersuchten Fälle) aller untersuchten Kolonkarzinome nachweisen. Die Intensität der Färbung lag bei 0,55. Diese Zahlen werden von den Untersuchungen von Clerc et al. (1997) bekräftigt. Clerc et al. untersuchten Proben aus Kolonkarzinomen von 12 verschiedenen Patienten mittels reverse Transkriptase PCR auf mRNA von CCKA-R und CCKB-R. CCKA-R-mRNA konnte in 5 von 12 Fällen im Kolonkarzinom nachgewiesen werden. CCKB-R-mRNA war nur in 2 von 12 Fällen im Kolonkarzinom nachweisbar.

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse ist wahrscheinlich in den unterschiedlichen verwendeten Techniken zu suchen. Des Weiteren wird von Imdahl et al. keine Aussage über die Herkunft der bei der Immunhistochemie benutzten Antikörper getroffen. Eine weitere Rolle könnten die, im Vergleich zu meiner Arbeit, relativ geringen Fallzahlen sowohl von Imdahl et al. (1995), als auch von Reubi et al. (1999) spielen.

4.1.6.1 GHRH-R

GHRH-R konnte in Zelllinien von Mamma-, Prostata,- und kleinzelligem Bronchialkarzinom nachgewiesen werden (Brabutis et al. 2008).

Hohla et al. (2008) untersuchten ähnlich der hier vorliegenden Arbeit, sowohl gesundes Kolongewebe als auch Adenokarzinome des Kolons auf GHRH-R mittels Immunhistochemie und RT-PCR. Die von ihnen verwendeten Antikörper waren allesamt von Hohla et al. (2008) selber hergestellt. Die Spezifität wurde von Toller et al. (2004) nachgewiesen. Die Kollegen beschränkten sich dabei nicht nur auf GHRH-R sondern untersuchten auch auf dessen Splice-Variante SV-1. Sie konnten zeigen, daß sowohl GHRH-R als auch SV-1 im Kolonkarzinom im Vergleich zu gesundem Kolongewebe signifikant stärker exprimiert wird. Dafür wurden Proben aus gesundem Kolon von 27 Patienten, Proben von Adenomen des Kolons von 7 Patienten und Proben von 9 Patienten mit einem Adenokarzinom des Kolons untersucht. In den ebenfalls untersuchten normalen und neoplastisch veränderten Geweben von Magen, Pankreas und Leber ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen. Hohla et al. (2009) konnten außerdem zeigen, daß der GHRH-Antagonist JMR-132 das Tumorstadium in vitro signifikant inhibierte und zu DNA-Schädigung und Apoptose der Tumorzellen führte.

Theophanous et al. (2009) untersuchten SV-1 des GHRH-R ebenfalls immunhistochemisch in gesundem Kolongewebe als auch in Adenokarzinomen des Kolons von 70 Patienten. Sie konnten SV-1 in allen untersuchten Geweben nachweisen, SV-1 war dabei zytosolisch lokalisiert. Des Weiteren konnte eine negative Korrelation zwischen Tumorgrad und pathologischem Staging mit dem Grad der Expression von SV-1 gezeigt werden.

Diese Ergebnisse werden zum Teil von der hier vorliegenden Arbeit unterstützt. So konnte ich auch wie Hohla et al. (2008) GHRH-R sowohl in gesundem als auch in neoplastisch verändertem Gewebe des Kolons nachweisen. Dies gelang in

gesundem Gewebe in 55,4% der Fälle und im Tumorgewebe in 59,6% der Fälle. Auch in meiner Arbeit zeigte sich die Lokalisation von GHRH-R stets zytoplasmatisch. Allerdings konnte ich keinerlei Korrelationen mit Tumorstadium oder Differenzierung des Tumors nachweisen. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse meiner und Hohlas Arbeit (Hohla et al. 2008) bezüglich der signifikanten Unterschiede zwischen Expression in Tumor und nicht Tumor mag in der subjektiven Beurteilung von immunhistochemischen Untersuchungen liegen. Des Weiteren benutzen Hohla et al. (2008) ebenfalls nichtkommerzielle Antikörper. Da die Spezifität der in beiden Arbeiten verwendeten Antikörper möglicherweise nicht vergleichbar ist, sind auch die Ergebnisse beider Arbeiten nur eingeschränkt vergleichbar.

5. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist eine der häufigsten malignen Tumorerkrankungen weltweit. Es ist bei Männern nach dem Bronchialkarzinom und bei Frauen nach dem Mammakarzinom die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache. Durch anfängliche Symptomarmut und noch nicht genügender Screeningbereitschaft in der Bevölkerung wird das kolorektale Karzinom häufig erst spät entdeckt. Die Prognose hängt maßgeblich vom UICC-Stadium und dem Differenzierungsgrad ab.

In der vorliegenden Arbeit wurden 11 verschiedene GPCR untersucht, die zum Teil bereits im Kolonkarzinom, zum Teil in anderen Karzinomen untersucht wurden. Die Mehrzahl der untersuchten GPCR stand bereits im Verdacht, an der Tumorgenese auf die eine oder andere Art und Weise beteiligt zu sein. Die Expression der GPCR im Kolonkarzinom wurde mittels Immunhistochemie mit der Expression der gleichen GPCR in korrespondierendem gesunden Kolongewebe untersucht und nach der Intensität der Färbung bewertet.

Alle untersuchten GPCR konnten sowohl in gesundem als auch in neoplastisch verändertem Kolonepithel nachgewiesen werden. Davon waren drei Rezeptoren signifikant und ein Rezeptor grenzwertig signifikant verändert exprimiert im Vergleich zum gesunden Kolonepithel. CXCR 4 ($p=0,006$) und BRS 3 ($p=0,0041$) waren im kolorektalen Karzinom signifikant mehrexprimiert gegenüber dem nichtneoplastischen Kolonepithel. NMBR war verstärkt exprimiert ($p=0,074$). Für VPAC 2 konnte eine signifikante Minderexpression im Tumor gegenüber dem gesunden Kolonepithel nachgewiesen werden ($p<0,0001$).

Eine Korrelation mit den einzelnen Tumorstadien konnte für PAC 1 und NMBR gezeigt werden. PAC 1 ist in lokal fortgeschrittenen Kolonkarzinomen (pT3/4) gegenüber Tumoren im Stadium pT1/T2 signifikant verstärkt exprimiert ($p=0,05$). Auch NMBR war in lokal fortgeschrittenen Tumoren verstärkt nachweisbar, erreichte jedoch auf Grund der geringen Fallzahl jedoch keine Signifikanz ($p=0,071$).

Eine Korrelation mit Lymphknoten- oder Fernmetastasen konnte für keinen der untersuchten GPCR nachgewiesen werden, was sicherlich an der geringen Fallzahl lag.

Die untersuchten GPCR zeigten sich meist zytosolisch. Ausnahmen bildeten dabei BRS 3, welches im Tumor eher in der Kernwand lokalisiert war, im gesunden Gewebe allerdings zytosolisch. Außerdem zeigte sich GRPR sowohl im Tumor als auch im gesunden Gewebe eindeutig membranär lokalisiert. NT 2 konnte im gesunden Gewebe an der Kernwand nachgewiesen werden, im Tumor jedoch zytosolisch. Des Weiteren war VPAC 2 ebenfalls wie NT 2 im gesunden Gewebe in der Kernwand zu finden, im Tumor aber im Zytosol.

Insgesamt sind die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse nur teilweise mit bereits existierenden Studien vereinbar. Die Gründe dafür liegen zu einem großen Teil in der Methodik. Die meisten hier zitierten Arbeiten untersuchen eine deutlich geringere Fallzahl, als die hier vorliegende Arbeit.

Des Weiteren unterscheiden sich die Nachweismethoden der verschiedenen Studien deutlich. Die Ergebnisse von RT-PCR und in vitro Autoradiographie lassen sich nicht ohne weiteres mit der Immunhistochemie vergleichen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, daß sich eine Vielzahl von GPCR in den Tumorzellen kolorektaler Karzinome nachweisen lassen. Einige davon (z.B. CXCR 4 und BRS 3) sind sogar signifikant stärker in den Tumorzellen exprimiert, als im korrespondierendem Nichttumorgewebe. Diese GPCR sollten nun weiterführenden Studien zugeführt werden, um ihren diagnostischen, prognostischen und therapeutischen Wert weiter zu validieren.

V. Literaturverzeichnis

- [1] Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomäki P, Chadwick RB, Kääriäinen H, Eskelinen M, Järvinen H, Mecklin JP, de la Chapelle A: Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med.* 338(21): 1481-7 (1998)
- [2] Almofti A, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Iga H, Yoshida H, Sato M: The Clinicopathological significance of the expression of CXCR 4 protein in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* (1): 65-71 (2004)
- [3] Anastasi A, Erspamer V, Bucci M: Isolation and structure of bombesin and alytesin, 2 analogous active peptides from the skin of the European amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia* 27:166–167 (1971)
- [4] Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, Morris SB, Burdick MD, Glass MC, Taub DT, Iannettoni MD, Whyte RI, Strieter RM: Interferon-gamma-inducible protein (IP-10) is an factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases. *J Exp Med.* Sep 1;184(3):981-92 (1996)
- [5] Baldwin GS: Antiproliferative gastrin/cholecystokinin receptor antagonists target the 78-kDa gastrin binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug. 2;91 (16):7593-7 (1994)
- [6] Balkwill F: The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR 4. *Semin Cancer Biol* Jun;14(3):171-9 (2004a)
- [7] Balkwill F: Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* Jul;4(7):540-50 (2004b)

- [8] Bartholdi MF, Wu JM, Pu H, Troncoso P, Eden PA, Feldman RI: In situ hybridization for gastrin-releasing peptide receptor (GRP receptor) expression in prostatic carcinoma. *Int J Cancer* 79(1):82-90 (1998)
- [9] Bockaert J, Pin JP: Molecular tinkering of G-protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* (7): 1723-9 (1999)
- [10] Brabutis N, Schally AV: Knocking down gene expression for growth hormone-releasing hormone inhibits proliferation of human cancer cell lines. *Br J Cancer* (11): 1790-6 (2008)
- [11] Bülow S, Faurschou Nielsen T, Bülow C, Bisgaard ML, Karlsen L, Moesgaard F: The incidence rate of familial adenomatous polyposis. Results from the Danish polyposis Register. *Int J Colorectal Dis.* 11(2):88-91 (1996)
- [12] de la Chapelle A: Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* (10): 769-80 (2004)
- [13] Chave HS, Gough AC, Palmer K, Preston SR, Primrose JN: Bombesin family receptor and ligand gene expression in human colorectal cancer and normal mucosa. *Br J Cancer* Jan;82(1):124-30 (2000)
- [14] Clerc P, Dufresne M, Saillan C, Chastre E, André T, Escrieut C, Kennedy K, Vaysse N, Gespach C, Fourmy D: Differential expression of the CCK-A and CCKA-B/gastrin receptor genes in human cancers of the esophagus, stomach and colon. *Int J Cancer* Sep 17;72(6):931-6 (1997)
- [15] Corjay MH, Dobrazanski DJ, Way JM, Viallet J, Shapira H, Worland P, Sausville EA, Battey JF: Two distinct bombesin receptor subtypes are expressed and functional in human lung carcinoma cells. *J Biol* 28: 18771-18779 (1991)

- [16] Cornelio DB, Meurer L, Roesler R, Schwartzmann G: Gastrin-releasing peptide receptor expression in cervical cancer. *Oncology* 73 (5-6): 340-5 (2007)
- [17] Coughlin SR: Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407 (6801): 258-64 (2000)
- [18] Cuttitta F, Carney DN, Mulshine J, Moody TW, Fedorko J, Fischler A, Minna JD: Autocrine growth factors in human small cell lung cancer. *Cancer Surv.* (4): 707-27 (1985)
- [19] Daaka Y: G proteins in cancer: the prostate cancer paradigm. *Sci STKE.* (216): re2 (2004)
- [20] Dobner PR, Fadel J, Deitemeyer N, Carraway RE, Deutch AY: Neurotensin-deficient mice show altered responses to antipsychotic drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.*: 98(14):8048-53 (2001)
- [21] Dong Z, Wang X, Evers BM: Site-specific DNA methylation contributes to neurotensin/neuromedin N expression in colon cancers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Dec; 279(6):G1139-47 (2000)
- [22] Dorsam RT, Gutkind JS: G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev cancer.* 7(2): 79-94 (2007)
- [23] Ehlers CL, Reed TK, Henriksen SJ: Effects of corticotrophin-releasing factor and growth hormone-releasing factor on sleep and activity in rats. *Neuroendocrinology* 42(6):467-74 (1986)
- [24] Erspamer V, Erpamer GF, Inselvini M: Some pharmacological actions of alytesin and bombesin. *J Pharm Pharmacol* 22: 875-876 (1970)
- [25] Even-Ram S, Uziely B, Cohen P, Grisaru-Granovsky S, Maoz M, Ginzburg Y, Reich R, Vlodaysky I, Bar-Shavit R: Thrombin receptor

- overexpression in malignant and physiological invasion process. *Nat Med.* (8): 909-14 (1998)
- [26] Evers BM, Ishizuka J, Chung DH, Townsend CM Jr, Thompson JC: Neurotensin expression and release in human colon cancer. *Ann Surg.* Oct;216(4):423-30; discussion 430-1 (1992)
- [27] Evers BM, Zhou Z, Dohlen V, Rajaraman S, Thompson JC, Townsend CM Jr: Fetal and neoplastic expression of the neurotensin gene in human colon. *Ann Surg.* May;223(5):464-70; discussion 470-1 (1996)
- [28] Fathi Z, Corjay MH, Shapira H, Wada E, Benya R, Jensen R, Viallet J, Sausville EA, Battey JF: BRS-3: a novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells. *J Biol Chem.* (8): 5979-84 (1993)
- [29] Fischer T, Nagel F, Jacobs S, Stumm R, Schulz S.: Reassessment of CXCR 4 chemokine receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-2. *PLoS One.* 2008;3(12):e4069. Epub Dec 31. (2008)
- [30] Ganten und Ruckpaul, Grundlagen der molekularen Medizin, 2. Auflage 2003, Springer Verlag S.21-23
- [31] Gui X, Guzman G, Dobner PR, Kadkol SS: Increased neurotensin receptor 1 expression during progression of colonic adenocarcinoma. *Peptides.* (9): 1609-15 (2008)
- [32] Herold, G. 2006: Innere Medizin, S. 426
- [33] Hohla F, Moder A, Mayrhauser U, Hauser-Kronberger C, Schally AV, Varga JL, Zarandi M, Buchholz S, Huber R, Aigner E, Ritter M, Datz C: Differential expression of GHRH receptor and its splice variant 1 in human

- normal and malignant mucosa of the oesophagus and colon. *Int J Oncol* Jul;33(1):137-43 (2008)
- [34] Hohla F, Buchholz S, Schally AV, Seitz S, Rick FG, Szalontay L, Varga JL, Zarandi M, Halmos G, Vidaurre I, Krishan A, Kurtoglu M, Chandna S, Aigner E, Datz C. GHRH antagonist causes DNA damage leading to p21 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. *Cell Cycle*. Oct 1;8(19):3149-56. (2009)
- [35] Imdahl A, Mantamadiotis T, Eggstein S, Farthmann EH, Baldwin GS: Expression of gastrin, gastrin/CCK-B and gastrin/CCK-C receptors in human colorectal carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol*. 121(11):661-6 (1995)
- [36] Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S: Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *Neuron* (8): 811-9 (1992)
- [37] Ji TH, Grossmann M, Ji I: G protein –coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem*. 273(28): 17299-302 (1998)
- [38] Jo WS, Chung DC: Genetics of hereditary colorectal cancer. *Seminars in Oncology* 32/1: 11-23 (2005)
- [39] Jordan NJ, Kolios G, Abbot SE, Sinai MA, Thopson DA, Petraki K, Westwick J: Expression of functional CXCR 4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells. *J Clin Invest*. Oct;104(8):1061-9 (1999)
- [40] Kennedy K, Escricut C, Dufresne M, Clerc P, Vaysse N, Fourmy D: Identification of a region of the N-terminal of the human CCKA receptor essential for the high affinity interaction with agonist CCK. *Biochem Biophys Res Commun*. 213(3): 845-52 (1995)

- [41] Kerkhofs M, Van Cauwer E, Van Obderbergen A, Caufriez A, Thorner MO, Copinschi G: Sleep-promoting effects of growth hormone-releasing hormone in normal men. *Am J Physiol* 264(4 Pt 1):E594-8 (1993)
- [42] Kiaris H, Schally AV, Kalofoutis A: Extrapituitary effects of the growth hormone-releasing hormone. *Vitam Horm.* (70): 1-24 (2005)
- [43] Kijima T, Maulik G, Ma PC, Tibaldi EV, Turner RE, Rollins B, Sattler M, Johnson BE, Salgia R: Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function, and signal transduction through CXCR 4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* 62(21): 6304-11 (2002)
- [44] Kinkead B, Dobner PR, Egnatashvili V, Murray T, Deitemeyer N, Nemeroff CB: Neurotensin-Deficient Mice Have Deficits in Prepulse Inhibition: Restoration by Clozapine but Not Haloperidol, Olanzapine, or Quetiapine. *J Pharmacol Exp Ther.*: (1):256-64 (2005)
- [45] Kovac JR, Chrones T, Preiksaitis HG, Sims SM: Tachykinin receptor expression and function in human esophageal smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 318(2):513-20 (2006)
- [46] Laburthe M, Couvineau A, Marie JC: VPAC receptors for VIP and PACAP. *Receptors Channels* (3-4): 137-53 (2008)
- [47] Lango MN, Dyer KF, Lui VW, Gooding WE, Gubish C, Siegfried JM, Grandis JR: Gastrin-releasing peptide receptor-mediated autocrine growth in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Natl Cancer Inst.* 94(5): 375-83 (2002)
- [48] Liu H, Pan Z, Li A, Fu S, Lei Y, Sun H, Wu M, Zhou W: Roles of the chemokine receptor 4 (CXCR 4) and chemokine ligand 12 (CXCL12) in metastasis of hepatocellular carcinoma cells. *Cell Mol Immunol.* (5): 373-8 (2008)

- [49] Liu Y, Gilcrease MZ, Henderson Y, Yuan XH, Clayman GL, Chen Z: Expression of protease-activated receptor 1 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 169(2): 173-80 (2001)
- [50] Luttrell LM: Transmembrane signalling by G protein-coupled receptors. *Methods Mol Biol.* 332: 3-49 (2006)
- [51] Maggi CA: The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol.* (5): 911-44 (1995)
- [52] Maggi CA, Catalioto RM, Criscuoli M, Cucchi P, Giuliani S, Lecci A, Lippi A, Meini S, Patacchini R, Renzetti AR, Santicioli P, Tramontana M, Zagorodnyuk V, Giachetti A: Tachykinin receptors and intestinal motility. *Can J Physiol Pharmacol* 75(6):696-703 (1997)
- [53] Malendowicz LK, Macchi C, Nussdorfer GG, Nowak M: The role of Neuromedin B in the regulation of rat pituitary-adrenocortical function. *Histol Histopathol* (4): 895-7 (1996)
- [54] Matusiak D, Glover S, Nathaniel R, Matkowskyi K, Yang J, Benya RV: Neuromedin B and its receptor are mitogens in both normal and malignant epithelial cells lining the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 288 (4): G718-28 (2005)
- [55] Mayo KE, Miller TL, DeAlmeida V, Zheng J, Godfrey PA: The growth-hormone-releasing hormone receptor: signal transduction, gene expression, and physiological function in growth regulation. *Ann N Y Acad Sci.* 805:184-203 (1996)
- [56] Minamino N, Kangawa K, Matsuo H: Neuromedin B: a novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun.* 114(2): 541-8 (1983)

- [57] Moody TW, Chan D, Fahrenkrug J, Jensen RT: Neuropeptides as autocrine growth factors in cancer cells. *Curr.Pharm Des.* (6): 495-509 (2003)
- [58] Morisset J, Wong H, Walsh JH, Lainé J, Bourassa J: Pancreatic CCK(B) receptors: Their potential roles in somatostatin release and delta-cell proliferation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279(1):G148-56 (2000)
- [59] Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A: Involvement of chemokine receptors in breast cancer. *Nature* 410(6824): 50-6 (2001)
- [60] Myers RM, Shearman JW, Kitching MO, Ramos-Montoya A, Neal DE, Ley SV: Cancer, chemistry, and the cell: molecules that interact with neurotensin receptors. *ACS Chem Biol.* Jul 17;4(7):503-25 (2009)
- [61] Noble F, Wank SA, Crawley JN, Bradwein J, Seroogy KB, Hamon M, Roques BP: International Union of Pharmacology. XXI. Structure, distribution, and functions of cholecystokinin receptors. *Pharmacol Rev* 52(1): 177 (1999)
- [62] Patacchini R, Maggi CA: tachykinin receptors and receptor subtypes. *Arch Int Pharmacody Ther.* 329(1):161-84 (1995)
- [63] Petit T, Davidson KK; Lawrence RA, von Hoff DD, Izbicka E: Neuropeptide receptor status in human tumor cell lines. *Anticancer Drugs.* Feb:12(2):133-6 (2001)
- [64] Phillips RJ, Mestas J, Gharaee-Kermani M, Burdick MD, Sica A, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM: Epidermal growth factor and hypoxia-induced expression of CXC chemokine receptor 4 on non-small cell lung cancer cells is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/mammalian target of rapamycin signaling pathway and

- activation of hypoxia inducible factor-1alpha. *J Biol Chem.* 280(23): 22473-81 (2005)
- [65] Pocher C, Juhem A, Peinnequin A, Bonaz B: Bombesin receptor subtype-3 is expressed by the enteric nervous system by interstitial cells of Cajal in the rat gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res.* Apr;230(1):21-31 (2005)
- [66] Polak JM, Sullivan SN, Bloom SR, Buchan AM, Facer MR, Pearse AG: Specific localization of neurotensin to the N cell in human intestine by radioimmunoassay and immunocytochemistry. *Nature.* Nov 10;270(5633):183-4 (1977)
- [67] Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW: Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *M Engl J Med.* 329(27):1982-7 (1993)
- [68] Rettenbacher M, Reubi JC: Localization and characterization of neuropeptide receptors in human colon. *Naunyn Schmiedbergs Arch Pharmacol.* Oct;364(4):291-304 (2001)
- [69] Rettori V, Milenkovic L, Fahim AM, Polak J, Bloom SR, McCann SM: Role of neuromedin B in the control of the release of thyrotropin in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(12) :4789-92 (1989)
- [70] Reubi JC, Wenger S, Schumuckli-Maurer J, Schaer JC, Gugger M: Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (25I-[D-Tyr6,-Ala11,Phe13,Nle14]bombesin6-14. *Clin Cancer Res* 8: 1139-1146 (2002)
- [71] Reubi JC, Schaer JC, Waser B: Cholecystokinin (CCK)-A and CCKB/Gastrin Receptors in Human Tumors. *Cancer Research* 57, 1377-1386 April (1997)

- [72] Reubi JC, Waser B, Gugger M, Friess H, Kleef J, Kaved H, Büchler MW, Laissue JA: Distribution of CCK1 and CCK2 receptors in normal and diseased human pancreatic tissue. *Gastroenterology*. 125(1): 98-106 (2003)
- [73] Reubi JC: In vitro evaluation of VIP/PACAP receptors in healthy and diseased human tissues. Clinical implications. *Ann N Y Acad Sci* (925) 1-25 (2000)
- [74] Reubi JC: In vitro identification of vasoactive intestinal peptide receptors in human tumors: implications for tumor imaging. *J. Nucl. Med.* 36: 1846-1853 (1995)
- [75] Reubi JC, Waser B, Schmassmann A, Laissue JA: Receptor autoradiographic evaluation of cholecystikinin, neurotensin, somatostatin and vasoactive intestinal peptide receptors in gastro.intestinal adenocarcinoma sampes: where are they really located? *Int J Cancer* May5;81(3):376-86 (1999)
- [76] Richard DE, Vouret-Craviari V, Pouyssegur J: Angiogenesis and G-protein-coupled receptors: signals that bridge the gap. *Ocogene*. Mar 26;20(13): 1556-62 (2001).
- [77] Riede, U.N., Werner, M., Schaefer, H.E. 2004: Allgemeine und spezielle Pathologie, S. 723-724
- [78] Roessner, A., Pfeifer, U. Müller-Hermelink, H. K. 2004: Allgemeine Pathologie, S. 336
- [79] Rosso M, Robles-Frias MJ, Covenas R, Salinas-Martin MV, Munoz M: The NK 1-receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer lines. *Tumor Biol.* (4) 245-54 (2008)

- [80] Rozengurt E: Early signals in the mitogenic response. *Science* 234(4773): 161-6 (1986)
- [81] Rozengurt E, Guha S, Sinnott-Smith J: Gastrointestinal peptide signalling in health and disease. *Eur J Surg Suppl.* (587): 23-38 (2002)
- [82] Rozengurt E: Signal transduction pathways in the mitogenic response to G protein-coupled neuropeptide receptor agonists. *J Cell Physiol.* 177(4): 507-17 (1998)
- [83] Ryan RR, Weber HC, Hou W, Sainz E, Mantey SA, Battey JF, Coy DH, Jensen RT: Ability of various bombesin receptor agonists and antagonists to alter intracellular signaling of the human orphan receptor BRS-3. *J Biol Chem.* 273(22): 13613-24 (1998)
- [84] Sankaran H, Goldfine ID, Deveney CW, Wong KY, Williams JA: Binding of cholecystokinin to high affinity receptors on isolated rat pancreatic acini. *J Biol Chem.* 255(5): 1849-53 (1980)
- [85] Sasaki K, Natsugoe S, Ishigami S, Matsumo M, Okumura H, Setoyama T, Uchikado Y, Kita Y, Tamotsu K, Hanazono K, Owaki T, Aikou T: Expression of CXCL12 and its receptor CXCR 4 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* (1) 65-71 (2009)
- [86] Scharl, Gessler, und von Eckardstein, *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*, Urban Fischer 2009, S.637-639
- [87] Schulz S, Röcken C, Mawrin C, Weise W, Höllt V, Schulz S Immunocytochemical identification of VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptors in normal and neoplastic human tissues with subtype-specific antibodies *Clin Cancer Res.* 2004 Dec 15;10(24):8235-42. (2004)

- [88] Schulz S, Röcken C, Mawrin C, Schulz S: Immunohistochemical localization of CCK1 cholecystokinin receptors in normal and neoplastic human tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(11): 6149-55 (2005)
- [89] Schulz S, Röcken C, Schulz S: Immunohistochemical detection of bombesin receptor subtypes GRP-R and BRS-3 in human tumors using novel anti-peptide antibodies. *Virchow Arch.* Oct;449(4):421-7. (2006a)
- [90] Schulz S, Röcken C, Schulz S.: Immunocytochemical localisation of plasma membrane GHRH receptors in human tumours using a novel anti-peptide antibody. *Eur J Cancer.* 2006 Sep;42(14):2390-6. Epub Aug 14. (2006b)
- [91] Schulz S, Stumm R, Röcken C, Mawrin C, Schulz S.: Immunolocalization of full-length NK1 tachykinin receptors in human tumors. *J Histochem Cytochem.* 2006 Sep;54(9):1015-20. Epub May 1. (2006c)
- [92] Schulz S, Röcken C, Ebert MP, Schulz S.: Immunocytochemical identification of low- affinity NTS2 neurotensin receptors in parietal cells of human gastric mucosa. *J Endocrinol.* 2006 Oct;191(1):121-8. (2006d)
- [93] Schulz S, Röcken C, Schulz S.: Immunohistochemical detection of bombesin receptor subtypes GRP-R and BRS-3 in human tumors using novel anti-peptide antibodies. *Virchows Arch.* 2006 Oct;449(4):421-7. Epub 2006 Sep 12. (2006e)
- [94] Scott N, Millward E, Cartwright EJ, Preston SR, Coletta PL: Gastrin releasing peptide and gastrin releasing peptide receptor in gastrointestinal carcinoid tumours. *J ClinPathol.* Feb;57(2):189-92 (2004)

- [95] Seitz HK, Stickelel F: Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. (8):599-612 (2007)
- [96] Sethi T, Herget T, Wu SV, Walsh JH, Rozengurt E.: CCKA and CCKB receptors are expressed in small cell lung cancer lines and mediate Ca²⁺ mobilization and clonal growth. *Cancer Res*. 1;53(21): 5208-13 (1993)
- [97] Sheward WJ, Lutz EM, Copp AJ, Harmar, AJ: Expression of PACAP, and PACAP type 1 (PAC 1) receptor mRNA during development of the mouse embryo, *Brain Res. Dev. Brain Res*. 109: 245-253 (1998)
- [98] Slattery ML, Curtin K, Wolff RK, Herrick JS, Caan BJ, Samowitz W: Diet, physical activity, and body size associations with rectal tumor mutations and epigenetic changes. *Cancer Causes Control* April 10 (2010)
- [99] Strate LL, Syngal S: Hereditary colorectal cancer syndromes. *Cancer Causes Control*. (3):201-13 (2005)
- [100] Sun B, Schally AV, Halmos G: The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers. *Regul Pept*. Jun 30;90(1-3):77-84 (2000)
- [101] Syngal S, Fox EA, Li C, Dovidio M, Eng C, Kolodner RD, Garber JE: Interpretation of genetic test results for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: implications for clinical predisposition testing. *JAMA* 282(3): 247-53 (1999)
- [102] Szepeshazi K, Schally AV, Nagy A, Halmos G: Inhibition of growth of experimental human and hamster pancreatic cancers in vivo by targeted cytotoxic bombesin analog. *Pancreas* (3): 275-82 (2005)
- [103] Tachikawa H, Harada S, Kawanishi Y, Okubo T, Suzuki T: Linked polymorphisms (- 333G>T and -186>G) in the promoter region of the CCK-A

- receptor gene may be associated with schizophrenia. *Psychiatry Res* 103(2-3):147-55 (2001)
- [104] Tasuta M, Iishi H, Baba M, Tangiguchi H: Enhancement by neurotensin of experimental carcinogenesis induced in rat colon by azoxymethane. *Br J Cancer Sep*;62(3):368-71. (1990)
- [105] Theophanous E, Petraki C, Scorilas A, Komborozos V, Veloudis G, Varga JL, Zarandi M, Schally AV, Koutsilieris M: The immunohistochemical expression of growth hormone releasing hormone receptor splice variant 1 is a favourable prognostic marker in colorectal cancer. *Mol Med. Jul-Aug*;15(7-8):242-7 (2009)
- [106] Toller GL, Horvath JE, Schally AV, Halmos G, Varga JL, Groot K, Chism D, Zarandi M: Development of a polyclonal antiserum for the detection of the isoforms of the receptor for human growth hormone-releasing hormone on tumors. *Proc Natl Acad Sci USA Oct 19*;101(42):15160-5 (2004)
- [107] Usdin TB, Bonner TI, Mezey E: two receptors for vasoactive intestinal polypeptide with similar specificity and complementary distributions. *Endocrinology* 135(6):2662-80 (1994)
- [108] Vertongen P, De Clerck P, Fourmet JC, Martelli H, Hélardot P, Devalck C, Peeters T, Sariban E, Robberecht P: Comparison between vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide levels in neuroblastoma tumour tissues, *Neuropeptides* (31): 404-413 (1997)
- [109] Vincent JP, Mazella J, Kitabgi P: Neurotensin and neurotensin receptors. *Trends Pharmacol Sci* (7): 302-9 (1999)
- [110] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL.: Genetic alterations during colorectal- tumor development. *N Engl J Med.* 1988 Sep 1;319(9):525-32.

- [111] Wang Y, Zhang M, Tan Y, Xiang Y, Liu H, Qu F, Qin L, Qin X: BRS-3 activation transforms the effect of human bronchial epithelial cells from PGE₂ mediated inhibition to TGF-beta1 dependent promotion on proliferation and collagen synthesis of lung fibroblasts. *Cell Biol Int.* (12):1495-500 (2007)
- [112] Weinberg DS, Ruggeri B, Barber MT, Biswas S, Miknyocki S, Waldman SA: Cholecystokinin A and B receptors are differentially expressed in normal pancreas and pancreatic adenocarcinoma. *J Clin Invest.* 100(3): 597-603 (1997)
- [113] Welton AF, Lad PM, Newby AC, Yamamura H, Nicosia S, Rodbell M: Solubilization and separation of the glucagon receptor and adenylate cyclase in guanine nucleotide-sensitive states, *J. Biol. Chem.* 252: 5947-5950 (1977)
- [114] Xiao D, Wang J, Hampton LL, Weber HC: The human gastrin releasing peptide receptor gene structure, its tissue expression and promoter. *Gene* 264(1): 95-103 (2001)
- [115] Zeng N, Athmann C, Kang T, Lyu RM, Walsh JH, Ohning GV, Sachs G, Pisegna JR: PACAP type one receptor activation regulates ECL cells and gastric acid secretion. *J Clin Invest.* (10): 1383-91 (1999)
- [116] Zlotnik A, Yoshie O: Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12(2): 121-7 (2000)

VI. Versicherung an Eides statt

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

Die Bedeutung der Expression der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren BRS 3, CCKA, CXCR 4, GHRH, GRPR, NK 1, NMBR, NT 2, PAC 1, VPAC 1 und VPAC 2 bei kolorektalen Tumoren in Abhängigkeit von Tumorstadium und Differenzierungsgrad

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

mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. med. Ch. Röcken

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.

München, den 06.12.2011

Veronika Drwal

VII. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Christoph Röcken. Ich möchte mich vor allem für die persönliche Betreuung und die kritische Begleitung in den letzten Jahren danken. Ohne seine stete Motivierung wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Albert Roessner, Direktor des Instituts für Pathologie und Dekan der medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg für die Ermöglichung der vorliegenden Dissertation danken.

Frau Carola Kügler und den anderen Mitarbeiterinnen der Immunhistologie danke ich für ihre Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung möchte Herrn Dr. rer. nat. Jan Budczies aus dem pathologischen Institut der Charité Berlin danken.

Herrn Dipl.Kfm. Felix Böhme danke ich für die stete Unterstützung in allen Lebenslagen, sowie bei der Lösung sämtlicher Computerprobleme.

Als letztes möchte ich meinen Eltern danken, ohne deren Motivation während meiner gesamten Ausbildung und auch speziell während der Arbeit an der vorliegenden Dissertation ich niemals soweit gekommen wäre.

VIII. Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Veronika Drwal

geboren am 12.05.1982 in Berlin

Ledig

Berufliche Laufbahn

März 2009-Oktober 2010

Assistenzärztin in der Allgemeinchirurgie
Krankenhaus Martha-Maria, München, da-
von 6 Monate Rotation in der Unfallchirurgie
der Sana Klinik München Solln

November 2010- Mai 2011

Assistenzärztin im Deutschen Herzzentrum
München, Intensivmedizin auf der herzchi-
rurgischen Intensivstation

Seit Juni 2011

Assistenzärztin für Orthopädie, Klinikum
der Universität Großhadern, München

Hochschulstudium

Seit 2002

Studium der Humanmedizin an der Otto-von-
Guericke-Universität Magdeburg

November 2008

Staatsexamen

2007-2008

Praktisches Jahr:

- Chirurgie, Kansas University Medical Center (USA)
- Wahlfach Anästhesie, Kantonsspital Liestal (Schweiz)
- Innere Medizin, Städtisches Klinikum Magdeburg

März 2007	Praxisfamulatur in Hanau (Hals-Nasen-Ohrenheilkunde)
August 2006	Famulatur am Chiba University Hospital in Chiba, Japan (Chirurgie)
März 2006	Famulatur an der Charité Berlin (Pathologie)
September 2005	Famulatur am Rambam University Hospital Haifa, Israel (Chirurgie)
März 2005	Famulatur im Kreiskrankenhaus Hofheim (innere Medizin)
2004	Ärztliche Vorprüfung
2001	Ableistung des Pflegepraktikums am Universitätsklinikum Frankfurt

Schulbildung

2001	Allgemeine Hochschulreife am Johann-Wolfgang-von-Goethe Gymnasium, Frankfurt am Main
------	--