

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Expression der Angiotensin II-Rezeptoren im Magenkarzinom -
Vergleich des immunhistologischen Nachweises zwischen
Magenschleimhautbiopsat und Magenresektat

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité–Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Liebig
aus Forst/L.

Gutachter: 1. Prof. Dr. med C. Röcken

2. Priv.-Doz. Dr. med A. Sturm

3. Priv.-Doz. Dr. med F. Lordick

Datum der Promotion: 19.11.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
1.1 Magenkarzinom/Definition.....	7
1.2 Epidemiologie	7
1.2.1 Geographische Verteilung.....	7
1.2.2 Geschlechts-, ethnologische und Altersverteilung.....	8
1.2.3 Überlebensrate.....	8
1.3 Ätiologie	10
1.3.1 Helicobacter pylori	10
1.3.2 Ernährungsfaktoren	11
1.3.3 Rauchen	12
1.3.4 Übergewicht.....	12
1.3.5 Andere Faktoren.....	13
1.4 Pathologie	14
1.4.1 Histologische Klassifikation der Magentumore nach WHO.....	14
1.4.2 Histologische Klassifikation der Magenkarzinome nach Laurén.....	15
1.4.3 TNM-Klassifikation der Magentumore	15
1.4.4 Prognose	18
1.5 Die Angiotensin-Rezeptoren	19
1.5.1 Struktur der Ang II Rezeptoren.....	19
1.5.2 Angiotensin II-Rezeptor Typ1	20
1.5.2.1 Regulation und Signalmechanismen	20
1.5.2.2 Vorkommen und Physiologie.....	22
1.5.3 Angiotensin II-Rezeptor Typ2	24
1.5.3.1 Regulation und Signalmechanismen	25
1.5.3.2 Vorkommen und Physiologie.....	26
1.5.4 Mas-Rezeptor	28
1.5.4.1 Signalmechanismen	29
1.5.4.2 Vorkommen und Physiologie.....	30
1.6 Das Angiotensin II-System und Tumorentwicklung.....	32
1.6.1 Pathophysiologie	32

1.6.1.1 Expression	32
1.6.1.2 ACE	33
1.6.1.3 Tumorwachstum und Angiogenese	33
1.6.1.4 AT2R und Mas-Rezeptor	34
1.6.1.5 AT1R und Tumorumgebung	34
1.6.1.6 Signalwege	35
1.6.2 Das lokale Angiotensin-System im Magenkarzinom	38
1.6.3 Fragestellung	39
2. Material und Methoden	41
2.1 Patientenkollektiv	41
2.2 Material	41
2.2.1 Chemikalien	41
2.2.2 Geräte	42
2.2.3 Antikörper	42
2.2.4 Färbekits	43
2.2.5 Puffer	43
2.3 Methoden	44
2.3.1 Gewebeschnitte	44
2.3.2 Immunhistochemische Färbung	44
2.3.2.1 AT1R	44
2.3.2.2 AT2R	45
2.3.2.3 Mas-Rezeptor	45
2.3.2.4 Kontrollen	46
2.4 Auswertung	47
2.5 Statistik	48
3. Ergebnisse	51
3.1 Charakterisierung des Untersuchungskollektivs	51
3.2 Immunhistochemie	53
3.2.1 Expression von AT1R	53
3.2.1.1 Verteilung der Immunreaktivität von AT1R	53
3.2.1.2 Grad der Expression vom AT1R	54
3.2.1.3 Statistik	54

3.2.2 Expression von AT2R.....	55
3.2.2.1 Verteilung der Immunreaktivität von AT2R.....	55
3.2.2.2 Grad der Expression vom AT2R.....	56
3.2.2.3 Statistik.....	57
3.2.3 Expression des Mas-Rezeptors.....	58
3.2.3.1 Verteilung der Immunreaktivität des Mas-Rezeptors.....	58
3.2.3.2 Grad der Expression des Mas-Rezeptors.....	59
3.2.3.3 Statistik.....	59
3.2.4 Vergleich von AT1R, AT2R und Mas-Rezeptor.....	59
3.2.4.1 Statistik.....	59
3.2.5 Kontrollen.....	60
3.2.6 Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse.....	61
4. Diskussion.....	65
4.1 Untersuchungskollektiv.....	65
4.2 Relevanz der immunhistochemischen Färbung.....	65
4.3 Auswertung.....	67
4.4 Ergebnisse.....	68
4.5 Schlussfolgerung.....	72
5. Zusammenfassung.....	73
6. Anhang.....	75
6.1 Literaturverzeichnis.....	75
6.2 Abkürzungsverzeichnis.....	85
6.3 Danksagung.....	87
6.4 Erklärung.....	88
6.5 Lebenslauf.....	89

1. Einleitung

1.1 Magenkarzinom/Definition

Die Mehrzahl der bösartigen Tumore des Magens (>90%) sind Adenokarzinome, die sich in der Regel vom Epithel der Magenschleimhaut ableiten. Im Magen können auch andere bösartige Tumore, wie z.B. Lymphome und Sarkome, auftreten. Die Adenokarzinome des Magens werden nach Laurén in zwei histologische Subtypen unterschieden: zum einen in den intestinalen Typ, zum anderen in den diffusen Typ. Nach der Topographie wird außerdem in den proximalen oder Kardial-Typ und den distalen oder Nonkardial-Typ unterschieden. Der intestinale Typ ist mit Korpus-prädominanter Gastritis, Magenatrophie und intestinalen Metaplasien vergesellschaftet, der diffuse Typ hingegen überwiegend mit Pangastritis ohne Atrophie (Crew und Neugut 2006).

1.2 Epidemiologie

In den letzten 70 Jahren sind weltweit das Auftreten und die Mortalität des Magenkarzinoms deutlich zurückgegangen (Parkin et al., 1985). Dessen ungeachtet war das Magenkarzinom im Jahr 2000, der vierthäufigste maligne Tumor weltweit, mit 870 000 neuen Fällen und 650 000 Toten pro Jahr (Stewart und Kleihues, 2003). Somit steht es an zweiter Stelle der Todesfälle bei den Karzinomen nach den Lungentumoren.

1.2.1 Geographische Verteilung

Etwa 60% aller Magenkarzinome treten in Entwicklungsländern auf. Gebiete mit einer besonders hohen Inzidenzrate sind Ostasien, die Andenregion in Südamerika und Osteuropa. Eine niedrige Rate haben Nordamerika, Nordeuropa, Nord- und Ostafrika und Südost-Asien. Japan und Korea haben die höchste Magenkarzinomrate in der Welt (Yamamoto, 2001). In Japan ist das Magenkarzinom der verbreitetste maligne Tumor bei Männern und Frauen. Migrationsstudien zeigten, dass sich das Karzinomrisiko in zwei Generationen stark ändert, wenn Populationen von Hochrisikoländern zu Niedrigrisikoländern wechseln. Japanische Immigranten in den USA behalten zum Beispiel ihr

eigentliches Risiko für Magenkarzinome, während die folgende Generation die Inzidenzrate des Gastlandes zeigt (Stewart und Kleihues 2003, McMichael 1980). In den geographischen Hochrisikogebieten, wie Ostasien, Osteuropa, Zentral- und Südamerika, dominiert der intestinale Typ (Munoz, 1988), dagegen zeigt der diffuse Typ eine eher uniforme weltweite Verteilung (Munoz et al., 1968).

1.2.2 Geschlechts-, ethnologische und Altersverteilung

Distale Magenkarzinome haben ein Verhältnis männlich zu weiblich von durchschnittlich 2:1 (Parkin et al., 1997, Nomura, 1996). Die Inzidenzraten sind signifikant höher bei Farbigen und in Gruppen mit niedrigem sozioökonomischen Status sowie in Entwicklungsländern (Crew und Neugut, 2006, Parkin et al., 1997). Unterschiede zeigen sich zum Kardiakarzinom, hierbei liegt das Verhältnis von Männern zu Frauen bei 1:5 und bei Weißen doppelt so hoch, wie bei Farbigen (Parkin et al., 1997). Die Inzidenzrate ist größer bei den höheren Berufsständen. Ein signifikanter Zusammenhang besteht zwischen dem Neuauftreten von Magenkarzinomen und dem Alter von Bevölkerungsgruppen. Bei Unterdreißigjährigen ist das Magenkarzinom extrem selten, in den älteren Altersgruppen steigt die Inzidenz rapide und stetig an, der Gipfel wird bei beiden Geschlechtern im hohen Alter erreicht (Stewart und Kleihues, 2003). Der intestinale Typ tritt häufiger bei Frauen, Farbigen und älteren Personen auf, der diffuse Typ hat eine gleichmäßige Geschlechterverteilung und tritt eher bei jüngeren Individuen auf (Crew und Neugut, 2006).

1.2.3 Überlebensrate

Obwohl die Mortalität in den meisten Gebieten der Erde rückläufig ist, hat das Magenkarzinom immer noch eine schlechte Prognose mit hoher Sterberate, nur übertroffen vom Lungenkarzinom. Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass Länder mit höherer Inzidenz auch eine höhere Überlebensrate zeigen (Verdecchia, 2004). Unterschiede gibt es auch in Bezug zur Lokalisation des Tumors. Karzinome im Bereich der Kardia haben im Vergleich eine schlechtere Prognose als solche im Antrum-/Pylorusbereich (Fielding et al., 1989). Die Möglichkeit von Frühuntersuchungen in Hochrisikoländern ließ die Mortalität sinken. So hat sich die Todesrate in Japan seit 1970 halbiert (IARC Unit of Descriptive Epidemiology: WHO cancer mortality databank, 2001). Die 5-Jahres-Über-

lebensrate variiert in den USA und Europa zwischen 10 und 20% (Ries et al., 1997, Faivre et al., 1998, Berrino et al., 1999). Die generelle Abnahme der Inzidenz des intestinalen Typs erklärt den allgemeinen Rückgang der jährlichen Zuwachsrates des Magenkarzinoms, wohingegen das Auftreten des diffusen Typs, besonders des Siegelringtyps, weiter zunimmt (Crew und Neugut, 2006).

1.3 Ätiologie

Das Magenkarzinom ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung. Die epidemiologischen Beobachtungen stützen die Vermutung, dass Umgebungs- und Lebensbedingungen wichtige Faktoren für die Entstehung des Magenkarzinoms sind.

1.3.1 *Helicobacter pylori*

H. pylori ist ein gram-negatives Bakterium, welches ätiologisch eng mit dem Magenkarzinom vergesellschaftet ist. Es kolonisiert den Magen und ist wahrscheinlich die verbreitetste chronische bakterielle Infektion weltweit (Marshall und Warren, 1984). Länder mit hoher Magenkarzinomrate haben eine hohe Prävalenz von *H. pylori*-Infektionen. Dementsprechend korreliert die Zunahme der *H. pylori*-Infektionen in den Entwicklungsländern mit dem Anstieg der Magenkarzinominzidenz (Parsonnet, 1995, Howson et al., 1986). Einen weiteren Zusammenhang gibt es zwischen dem Auftreten der Infektionen und der Alterszugehörigkeit der Betroffenen. In den USA liegt die Prävalenz für *H. pylori*-Infektionen bei unter 20% bei den Zwanzigjährigen und bei 50% bei den Fünfzigjährigen (Dooley et al., 1989). In Japan beträgt sie ebenfalls 20% bei den Zwanzigjährigen, steigt aber bei den über Vierzigjährigen auf 80% an (Asaka et al., 1992). Die Zunahme der Prävalenz ist größtenteils eher einem Geburtskohorteneffekt als einem späteren Zeitpunkt der Infektion zuzuschreiben. Die *H. pylori*-Infektion erfolgt meistens in früher Kindheit durch orale Nahrungsaufnahme und persistiert zeitlebens (Feldman, 2001). Die Prävalenz ist eng verbunden mit sozioökonomischen Faktoren, wie geringem Einkommen, geringem Bildungsstandard, schlechten sanitären Bedingungen und Überbevölkerung. Der ätiopathogenetische Zusammenhang zwischen chronischer *H. pylori*-Infektion und der Entwicklung vom Magenkarzinom gilt als gesichert (Crew und Neugut, 2006). Die *International Agency for Research on Cancer* klassifizierte 1994 *H. pylori* als Typ I Karzinogen beim Menschen (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1994). Nach Correa's Modell der Magenkarzinogenese führt die *H. pylori*-Infektion über die chronische Gastritis zu Magenatrophie, intestinaler Metaplasie, Dysplasie und schließlich zum Magenadenokarzinom (Correa, 1996). Verschiedene Fallkontroll-Studien haben den signifikanten Zusammenhang zwischen *H. pylori*-Seropositivität und Magenkarzinomrisiko gezeigt. So ist das Risiko bei Infizierten zwischen 2-16mal höher als bei *H. pylori*-Seronegativen

(Sipponen et al., 1996, Hansson et al., 1993, Hu et al., 1994, Kikuchi et al., 1995, Kokkula et al., 1996, Barreto-Zuniga et al., 1997, Miehlke et al., 1997). Prospektive Studien haben ebenfalls den Zusammenhang zwischen *H. pylori*-Infektionen und Magenkarzinomrisiko dargelegt (Passonet et al., 1991, Forman et al., 1991, Nomura et al., 1991, Nomura et al., 1995).

Die Auswirkungen von *H. pylori*-Infektionen auf die Tumorentwicklung variieren unter den verschiedenen anatomischen Gegebenheiten. Der abnehmenden Inzidenz von *H. pylori*-Infektionen und nichtkardialen Karzinomen in Entwicklungsländern steht die rapide Zunahme von Kardiakarzinomen gegenüber (Blaser, 1999). Eine Meta-Analyse von prospektiven Kohortenstudien zeigt, dass die *H. pylori*-Infektion mit einem Risiko für nichtkardiale Magenkarzinome verbunden ist, nicht aber mit Kardiakarzinomen (Helicobacter and Cancer Collaborative Group, 2001). In den westlichen Ländern sinkt die *H. pylori*-Prävalenz, während die Prävalenz der gastroösophagealen Refluxkrankheit (GERD) und ihrer Folgen ansteigt. Verschiedene Studien zeigten, dass gerade die *H. pylori*-Infektionen verbunden mit reduzierter Säurebildung und schwerer Magenatrophie das Risiko für GERD signifikant senken (Warburton-Timms et al., 2001, El-Serag et al., 1999, Koike et al., 2001, Raghunath et al., 2003). Außerdem zeigten mehrere Studien, dass die therapeutische Beseitigung von *H. pylori* mit einer Zunahme des Risikos für Oesophagitis und Adenokarzinomen der Magenkardia einhergeht (Laine und Sugg, 2002, Sasaki et al., 2003, Manes et al., 2001, McColl et al., 2000, Vakil et al., 2000). Der protektive Effekt von *H. pylori* gegen Kardiakarzinome wird weiterhin kontrovers diskutiert.

1.3.2 Ernährungsfaktoren

Nicht allein die Infektion mit *H. pylori* erhöht das Risiko für die Entstehung eines Magenkarzinoms, auch besondere und einseitige Ernährungsgewohnheiten können das Tumorrisiko steigern. Es gilt als bewiesen, dass eine unzureichende Aufnahme von frischem Obst und Gemüse, sowie ein hoher Konsum von Salz und Räucherwaren, das Risiko erhöhen. Besonders die Aufnahme gesalzener Speisen erhöht das Risiko einer *H. pylori*-Infektion und somit die Entstehungswahrscheinlichkeit eines Magenkarzinoms (Crew und Neugut, 2006). Im Tiermodell wurde belegt, dass Läsionen der Mukosa, ver-

ursacht durch Salzaufnahme, die Möglichkeit einer persistierenden *H. pylori*-Infektion steigern (Fox et al., 1999).

Die weltweite Abnahme der Inzidenz des Magenkarzinoms ist zum Teil auf das Aufkommen der Kühltechnik für Lebensmittel zurückzuführen, da Obst und Gemüse somit das ganze Jahr über verfügbar sind und Salz als Konservierungsmittel stark rückläufig ist (Stewart und Kleihues, 2003). Tierversuche haben gezeigt, dass Polyphenole in grünem Tee einen entzündungshemmenden und tumorschützenden Effekt haben. Demnach haben Polyphenole eine Antioxidantienwirkung und inhibieren die Nitrosierung von Nitriten aus Nahrungsmitteln. Beides wird als ätiologischer Risikofaktor des Magenkarzinoms angesehen (Wang et al., 1989, Wang et al., 1992, Xu et al., 1992). Verschiedene Fallkontroll-Studien zeigten ein reduziertes Tumorrisiko im Verhältnis zum Konsum von grünem Tee. Aber neuere prospektive Kohortenstudien fanden keinen protektiven Effekt von grünem Tee in Bezug auf das Magenkarzinom (Tsubono et al., 2001, Hoshiyama et al., 2002, Nagano et al., 2001).

1.3.3 Rauchen

Prospektive Studien belegen eine signifikante dosisabhängige Verbindung zwischen Rauchen und Magenkarzinomrisiko (Koizumi et al., 2004, Gonzales et al., 2003, Chao et al., 2002). In einer großen europäischen prospektiven Studie wurde beschrieben, dass 17,6% der Magenkarzinomfälle mit Rauchen assoziiert sind (Gonzales et al., 2003). Diese Untersuchung vergleicht außerdem das Magenkarzinomrisiko von Rauchern mit Nichtrauchern. Das Verhältnis liegt hierbei bei 1:1,5-1,6 mit einem etwas höheren Anteil bei Männern als bei Frauen.

1.3.4 Übergewicht

Übergewicht ist ein Hauptrisikofaktor für Adenokarzinome der gastroösophagealen Übergangszone (Chow et al., 1998, Vaughan et al., 1995). Adipositas kann den gastroösophagealen Reflux fördern, welcher einen Barrettösophagus nach sich ziehen kann, einen metaplastischen Vorläufer für Adenokarzinome des Ösophagus (Clark et al., 1994, Ishaq und Jankowski, 2001). Eine schwedische Studie berichtet über das Ansteigen des Kardiakarzinomrisikos um das 2,3-fache bei Schwergewichtigen verglichen mit

Normalgewichtigen (Lagergreen et al., 1999). Eine weitere prospektive amerikanische Studie berichtet, dass ein ansteigender Body-Mass-Index signifikant mit höheren Raten der Magenkarzinommortalität assoziiert ist (Calle et al., 2003).

1.3.5 Andere Faktoren

Weitere Risikofaktoren für ein Magenkarzinom sind Bestrahlung (Thompson et al., 1958-1987), perniziöse Anämie (Hysing et al., 1993), Blutgruppe A (Aird et al., 1953), vorhergegangene Therapie bei benignen Tumoren (Stalnikowicz und Benbassat, 1990) und eine Epstein-Barr-Virus-Infektion (Levine et al., 1995). Außerdem ist eine positive Familienvorgeschichte mit genetischen Syndromen, wie dem hereditären nichtpolypösen Kolonkarzinom und dem Li-Fraumeni-Syndrom, ein signifikanter Risikofaktor (Palli et al., 1994, Lissowska et al., 1999).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich Kardia- und Nichtkardiakarzinome epidemiologisch und ätiologisch voneinander unterscheiden. Eine *H. pylori*-Infektion und Ernährungseinflüsse sind die wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung des distalen Magenkarzinoms. GERD und Übergewicht stehen im Vordergrund bei der Entstehung des proximalen Magenkarzinoms.

1.4 Pathologie

1.4.1 Histologische Klassifikation der Magentumore nach WHO.

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterteilt die epithelialen Tumore des Magens in verschiedene Typen, die in Tabelle 1 aufgelistet sind.

Tabelle 1: Histologische WHO-Klassifizierung der Magentumore

Intraepitheliale Neoplasien-Adenome	8140/0
Karzinome	
Adenokarzinome	8140/3
Intestinaler Typ	8144/3
Diffuser Typ	8145/3
Papilläres Adenokarzinom	8260/3
Tubuläres Adenokarzinom	8211/3
Muzinöses Adenokarzinom	8480/3
Siegelringzellkarzinom	8490/3
Adenosquamöses Karzinom	8560/3
Squamöses Zellkarzinom	8070/3
Kleinzellkarzinom	8041/3
Undifferenziertes Karzinom	8020/3
Karzinoid (gutdifferenzierte endokrine Neoplasie)	8240/3

1.4.2 Histologische Klassifikation der Magenkarzinome nach Laurén

Eine weitere, allgemein gebräuchliche Klassifikation der Magenadenokarzinome wurde 1965 von Laurén erarbeitet und ist in Tabelle 2 zusammengefasst (Laurén, 1965).

Tabelle 2: Histologische Klassifizierung der Magenkarzinome nach Laurén

Typus	Histologie	Ätiologie/Prädisposition	Prognose
Intestinaler Typ	Abgrenzbare Tumormasse mit Drüsenstruktur, expansive Ausbreitung im geschlossenen Zellverband	Umwelt- u. Ernährungsfaktoren (Nitrate, Nitrosamine, Benzopyrene), Enzym polymorphismus (Hydroxylierer-, Acetylierer-Phänotyp)	Günstiger, seltener Lymphknotenmetastasen, höhere Kurabilität
Diffuser Typ	Diffus infiltrativ wachsend ohne Drüsenstruktur, ausgedehnte in Zellnestern verstreute Tumorausbreitung	Genetische Faktoren (Blutgruppe A, Gynäkotropie), jüngeres Lebensalter	Ungünstig, Gastrektomie erforderlich, häufig ausgedehnte Lymphknotenmetastasen

1.4.3 TNM-Klassifikation der Magentumore

Tabelle 3 gibt die TNM-Klassifikation der *International Union Against Cancer* (UICC) von 2002, 6. Auflage, wieder. Diese dient der Beschreibung der Tumorausdehnung und unterscheidet die lokale Tumorausbreitung (T-Kategorie), die lymphogene Metastasierung (N-Kategorie) und die Fernmetastasen (M-Kategorie). Als regionale Lymphknotenmetastasen werden die perigastrischen Lymphknoten entlang der kleinen und großen Kurvatur, der A. gastrica sinistra, A. hepatica communis, A. coeliaca, der A. lienalis und die hepatoduodenalen Lymphknoten bezeichnet. Befallene retropankreatische, mesenteriale oder paraaortale Lymphknoten, gelten als Fernmetastasen.

Tabelle 3: TNM: Klinische Klassifikation nach UICC 2002, 6. Auflage

T	Primärtumor
TX	Die Minimalerfordernisse zur Bestimmung des Sitzes oder Ausbreitungsgrades des Primärtumors liegen nicht vor
T0	keine Evidenz für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ: intraepithelialer Tumor ohne Invasion in Lamina propria
T1	Tumor infiltriert Lamina propria oder Submucosa
T2	Tumor infiltriert Muscularis propria oder Subserosa
T2a	Invasion der Muscularis propria
T2b	Invasion der Subserosa
T3	Tumor erreicht die Serosa ohne umgebende Strukturen zu infiltrieren
T4	Tumor infiltriert umgebende Strukturen
N	Regionale Lymphknoten
NX	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung der regionalen Lymphknoten liegen nicht vor
N0	keine Evidenz für Befall regionaler Lymphknoten
N1	Metastasen in 1 bis 6 regionalen Lymphknoten
N2	Metastasen in 7 bis 15 regionalen Lymphknoten
N3	Metastasen in mehr als 15 regionalen Lymphknoten
M	Fernmetastasen
MX	Die Minimalerfordernisse zur Beurteilung des Vorhandenseins von Fernmetastasen liegen nicht vor
M0	keine Evidenz für Fernmetastasen
M1	Evidenz für Fernmetastasen

Stadieneinteilung des Magenkarzinoms

Aus der TNM-Klassifikation leitet sich die Stadieneinteilung des Magenkarzinoms der UICC von 2002 ab. Diese ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: UICC Stadieneinteilung 2002, 6. Auflage

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1	N0	M0
Stadium IB	T1	N1	M0
Stadium II	T2a,b	N0	M0
	T1	N2	M0
	T2a,b	N1	M0
Stadium IIIA	T3	N0	M0
	T2a,b	N2	M0
	T3	N1	M0
Stadium IIIB	T4	N0	M0
	T3	N2	M0
Stadium IV	T4	N1, N2, N3	M0
	T1, T2, T3	N3	M0
	jedes T	jedes N	M1

1.4.4 Prognose

Der wichtigste prognostische Faktor ist das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Operation. Im westeuropäischen Raum betragen die 5-Jahres-Überlebensraten ca. 65% im Stadium I, 22% im Stadium II und 5% im Stadium III. Im Stadium IV ist eine 5-Jahres-Überlebenszeit nicht zu erwarten. Eine besondere Relevanz erhalten diese Daten, wenn man die Inzidenz der einzelnen Tumorstadien berücksichtigt, diese liegt bei Frühkarzinomen nur bei ca. 10% und beträgt etwa 70% im Stadium III und IV (Roukos, 2000).

1.5 Die Angiotensin-Rezeptoren

Angiotensin II (Ang II), ein Octapeptid-Hormon, ist die aktive Komponente des Renin-Angiotensin-Systems (RAS). Es wird systemisch durch das renale RAS und im Gewebe durch das lokale Angiotensin-System (LAS) bereitgestellt. Angiotensin wurde 1940 erstmals von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen, Braun-Menendez und Page und Helmer beschrieben. In Argentinien nannte man es „Hypertensin“ (Braun-Menendez et al. 1940) und in Amerika „Angiotonin“ (Page und Helmer 1940). Page und Braun-Menéndez beschrieben das hoch potente Pressor-Octapeptid 1958 als Angiotensin. Nach dieser bedeutenden Entdeckung wurden die anderen Strukturen des Systems, wie Angiotensinogen, Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) und die Angiotensine I, II und III charakterisiert. Das Angiotensin-System beeinflusst die Blutdruckregulation, das Plasmavolumen und potenziert das sympathische Nervensystem. Ang II ist außerdem an diversen Wachstumsvorgängen, wie Proliferation, Differenzierung, Regeneration und Apoptose beteiligt.

Die vielen verschiedenen Wirkungen von Ang II erfolgen über hoch spezifische und komplexe intrazelluläre Signalkaskaden, welche durch die Bindung des Peptidhormons an Rezeptoren der Zelloberfläche angeregt werden. Der Großteil der Wirkungen wird durch zwei Subtypen des G-Protein-gekoppelten Angiotensin-Rezeptors vermittelt: den Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT1R) und den Angiotensin II-Rezeptor Typ 2 (AT2R).

1.5.1 Struktur der Ang II Rezeptoren

Der AT1R und der AT2R gehören zur Superfamilie der heptahelikalen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese bestehen aus Helixstrukturen, die sieben Mal die Zellmembran durchkreuzen. Die sieben Untereinheiten sind durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren verfügen über eine extrazelluläre oder transmembranäre Bindungsdomäne für einen Liganden. Das G-Protein bindet an der intrazellulären Domäne. Die sieben die Membran durchbrechenden helikalen Domänen verankern hauptsächlich den Rezeptor in der Zellmembran, außerdem besteht an den Transmembrandomänen III-VI die Möglichkeit, einen Liganden zu binden. Charakteristisch für die Transmembrandomänen ist die typische Aminosäuresequenz. Die extrazelluläre Domäne besitzt an ihrem N-termi-

nen Ende die primäre Ligandenbindungsstelle und auf der intrazellulären Seite befindet sich die Bindungsstelle für G-Proteine und andere Signalmoleküle (De Gasparo et al., 2000).

1.5.2 Angiotensin II-Rezeptor Typ 1

1.5.2.1 Regulation und Signalmechanismen

Das menschliche AT1R-Gen ist auf der Bande q22 des Chromosomen 3 lokalisiert. Der menschliche AT1R besteht aus 359 Aminosäuren und ist zu 95% identisch mit dem Ratten- und Rinder-AT1R (Curnow et al., 1992). Die AT1R-Expression wird dynamisch durch verschiedene zelluläre und molekulare Mechanismen reguliert, welche noch nicht völlig verstanden werden. Die Regulation erfolgt wahrscheinlich sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationeller Ebene (Kaschina und Unger, 2003).

Ang II sorgt selber für eine Herabregulation von AT1R in verschiedenen Zelltypen, wie in glatten Gefäßmuskelzellen (Ichiki et al., 2001) und Mesangialzellen (Makita et al., 1992). Die Regulation von AT1R steht in Zusammenhang mit verschiedenen anderen Beeinflussungen durch Gluco- und Mineralokortikoide (Della Bruna et al., 1995), Insulin (Nickenig et al., 1998), Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor (IGF) (Wyse und Sernia, 1997), Stickstoffmonoxid (NO) (Ichiki et al., 1998) und dem Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) (Guo und Inagami, 1884). Zum Beispiel wird AT1R in glatten Gefäßmuskelzellen durch Östrogen und *all-trans retinoic acid* herunter und durch Progesteron hoch reguliert (Kaschina und Unger, 2003). Die Regulation des AT1R variiert ebenfalls unter verschiedenen pathophysiologischen Einflüssen, wie renovaskulären Bluthochdruck, Myokardinfarkt, ventrikulärer Hypertrophie und beidseitiger Nephrektomie (De Gasparo et al., 2000). Diese kurze Aufzählung zeigt die mögliche Beteiligung des Angiotensin II-Systems bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, eine genauere Betrachtung der Beeinflussung von Tumorwachstum und Entwicklung folgt in Kapitel 1.6.

Der Vorläufer des Angiotensins ist das Angiotensinogen, welches auch im Gehirn produziert wird. Renin, eine Aspartyl-Protease, greift am N-Terminus des Angiotensinogens an und synthetisiert daraus das Angiotensin I (Ang I). Durch das ACE, wird aus Ang I das Ang II gebildet. Zudem kann über das ACE Angiotensin(1-7) (Ang(1-7)) her-

gestellt werden. Ang II bindet vor allem an die extrazelluläre Region des AT1R mit Beteiligung von Aminosäuren, Zystein-Resten und polaren Gruppen des N-terminalen Endes und der ersten und dritten Schleife. Auch die transmembranären Helixstrukturen sind an der Ang II-Bindung beteiligt, Bindungsstellen sind hierbei Aminosäuren von Helix III-VII. Die Anlagerung des Liganden aktiviert den Rezeptor und dieser ändert seine dreidimensionale Struktur. Durch die Konformationsänderung kann der Rezeptor als Guanosintriphosphat (GTP)-Austauschfaktor für ein gebundenes G-Protein fungieren. Der Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen GTP destabilisiert das G-Protein, worauf dieses in seine aktiven Bestandteile dissoziiert. Diese Untereinheiten können die Phospholipase C (PLC) aktivieren, welche zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol, zur Bildung von Inositrtriphosphat (IP₃) und zur Diacylglycerol (DAG)-Anreicherung führt. IP₃ öffnet die intrazellulären Calziumspeicher mit der Folge einer Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzellen und der Sekretion von Aldosteron im Nebennierencortex (Kaschina und Unger, 2003). Die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) durch DAG führt zur Phosphorylierung von Schlüsselproteinen, die bei Wachstumsvorgängen und Gefäßkontraktion beteiligt sind. Im Detail aktiviert PKC Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinase). Deren wichtigste Vertreter sind die *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK 1/2). Die ERK 1/2 Signalkaskaden führen zu einer Vielzahl von Wirkungen im Zellkern und Zytoplasma, wie die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die Aktivierung von Kinasen im Kern und somit die Stimulation der Transkription. Im Zytoplasma werden weitere Kinasen phosphoryliert, in der Folge werden ebenfalls Transkriptionsfaktoren aktiviert, das Chromatin-Remodelling beeinflusst und die Proteinsynthese gesteigert, der Zellzyklus reguliert und die Apoptose gehemmt. Außerdem kann der AT1R durch Aktivierung der JAK-STAT Signalkette (*Janus cytosolic protein kinase-signal transducers and activators of transcription*), Informationen von der Zelloberfläche an das Zytoplasma und den Zellkern weitergeben. Diese bewirkt vor allem die Stimulierung von *early growth response*-Genen durch Ang II, die Zunahme von Genexpression und Produktion von Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF, TGF- β , IGF-1, bFGF, PAF), Vasokonstriktorsubstanzen (ET-1), Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, E-Selectin), Integrinen und Tumornekrosefaktor- α . Auf diesem Weg kontrolliert Ang II Zellwachstum, Adhäsion und Migration, Gefäß und kardiales Wachstum, Remodelling und Reparaturprozesse bei Arteriosklerose. Ang II stimuliert Phospholipase A₂ (PLA₂)-Aktivität, welche

die Freisetzung von Arachidonsäure aus Zellmembranphospholipiden ermöglicht. Arachidonsäure ist bei vielen Regulierungsprozessen von Gefäß- und renalen Mechanismen beteiligt, wie Blutdruck und Zellwachstum. Außerdem kann AT1R die Produktion von Sauerstoffradikalen (ROS) in verschiedenen Zelltypen anregen, diese beeinflussen die Vasopressoraktivität, Hypertrophie von glatten Muskelzellen, die Induktion von IGF-1-Rezeptor, Interleukin (IL)-6-Produktion und endotheliale VCAM-1-Stimulation, bedeutend bei Zell-Zell-Interaktion und Arteriosklerose (De Gasparo et al., 2000, Kaschina und Unger, 2003).

1.5.2.2 Vorkommen und Physiologie

Der Mensch besitzt einen AT1R ohne Isoformen. In den Gefäßen kommen eine hohe Rezeptordichte in den glatten Muskelzellen und eine geringe in der Adventitia vor. In der Niere gibt es starke Rezeptorsignale in den Interlobulararterien und in der tubulointerstitiellen fibrösen Region um die Interlobulararterien und Glomeruli, weniger in den Glomeruli und den kortikalen Tubuli selbst. AT1R wurde ebenfalls im Endometrium, der Lunge und in der Zona glomerulosa der Nebenniere beschrieben. Im Gehirn wurden AT1R und ACE-Rezeptoren in der Substantia nigra, im Nucleus caudatus und dem Putamen nachgewiesen (De Gasparo et al., 2000). Ang II sorgt via AT1R für eine Konstriktion präkapillärer Arteriolen und in geringerem Ausmaß postkapillärer Venolen. Die Vasokonstriktion ist am stärksten in den Nieren und am schwächsten in den Gefäßen des Gehirns, der Lunge und der Skelettmuskulatur. Diese Aktion erfolgt sowohl durch zirkulierendes Ang II, als auch durch lokal im Gewebe produziertes Ang II (Laragh, 1987). Die Expression von AT1R im Hypothalamus und Hirnstamm beeinflusst viele periphere physiologische Parameter, wie Blutdruck, Natriumaufnahme, Natriurese und Vasopressinfreisetzung (Culmann et al., 2001). Ang II agiert über AT1R bei einem Großteil der Nierenfunktionen: Steuerung der glomerulären Filtration, Erleichterung der Natriumrückresorption im proximalen Tubulus, Regulation von Zellwachstum und Differenzierung in der Niere (Chung und Unger, 1998). AT1R stimuliert die Sekretion von Aldosteron aus der Nebennierenrinde, dies erhöht wieder die Natriumrückresorption, vermehrt die Kaliumausscheidung und erhöht das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen. Die Wirkungen, welche am Herzen über AT1R gesteuert werden, umfassen positive Inotropie, Zellwachstum im linken Ventrikel und ein erhöhtes Risiko für ventrikuläre Arrhythmien. Wei-

terhin gibt es Verbindungen zwischen einer erhöhten Thromboseneigung und dem Angiotensin II- System. Über AT1R werden die Produktion von Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) stimuliert, Plättchen sensibilisiert, sowie Sauerstoffradikale produziert, welche freies NO beseitigen und die Expression von Gewebefaktoren induzieren. Ang II ist auch bei den pathologischen Vorgängen der Arteriosklerose beteiligt. Ang II fördert die Rekrutierung von Makrophagen in der Gefäßwand, die Oxidation von Lipoproteinen geringer Dichte (LDL) und den Abbau von NO. Ein Fehlen von NO hat viele Auswirkungen auf die Gefäßphysiologie, NO hat einen ausgeprägten gefäßprotektiven Charakter, welcher die Entwicklung von Arteriosklerose bremst (Kaschina und Unger, 2003).

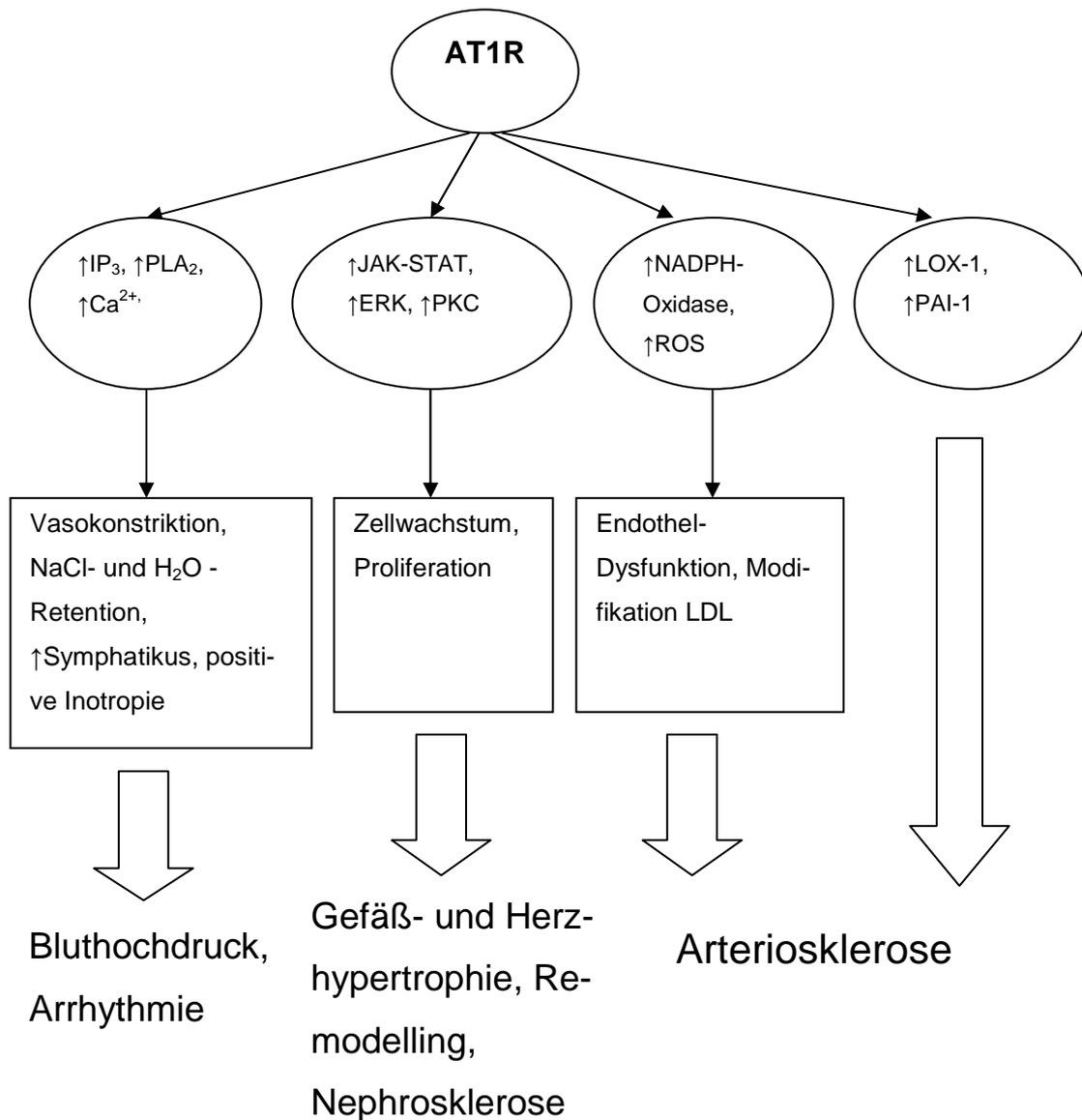


Abbildung 1: AT1R-vermittelte Signalwege und Effekte. Abkürzungen: IP₃, Inositriphosphat; PLA₂, Phospholipase A₂; JAK, *Janus cytosolic protein kinase*; STAT, *signal transducers and activators of transcription*; ERK, *extracellular signal-regulated kinase*; PKC, Proteinkinase C; NADPH -Oxidase, Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphatoxidase; ROS, Sauerstoffradikale; LOX-1, Lipoproteinrezeptor 1; PAI-1, Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (nach Kaschina und Unger, 2003)

1.5.3 Angiotensin II-Rezeptor Typ 2

Der Großteil der biologischen Wirkungen von Ang II wird durch AT1R gesteuert. Unser Wissen über die funktionelle Rolle des AT2R hat in den letzten zehn Jahren stark zugenommen, dies umfasst vor allem die Modulation komplexer biologischer Programme, wie Embryonalentwicklung, Zelldifferenzierung, Gewebereparatur und Apoptosis.

1.5.3.1 Regulation und Signalmechanismen

Beim Menschen liegt das AT2R-Gen auf Chromosomen 10 bei q23-q24. Der AT2R besteht aus 363 Aminosäuren und stimmt nur zu 24-33% mit der Aminosäuresequenz des AT1Rs überein. Die Homologie besteht hauptsächlich in den hydrophoben transmembranären Domänen (Nakajima et al., 1993). Der AT2R wird in großer Zahl im Fötus exprimiert, nach der Geburt fällt die Expression in den meisten Geweben steil ab. Die Genexpression des AT2Rs wird von vielen Faktoren reguliert. *In vitro*-Experimente zeigen, dass eine Herabregulation in verschiedenen Geweben durch Ang II, Norepinephrin (Kijima et al., 1996), Wachstumsfaktoren (EGF, *nerve growth factor*, *platelet-derived growth factor*) und Glucokortikoide (Matsubara und Inada 1998) erreicht wird. Die AT2R-Stimulation erfolgt durch Insulin, IGF, *interferon regulatory factor-1* und 2 und IL 1 β (Unger, 1999). *In vivo*-Studien haben gezeigt, dass Östrogen für einen Anstieg von AT2R im Myometrium sorgt (Mancania et al., 1996), während Aldosteron zu einer Abnahme der Expression im Nebennierenmark führt (Wang et al., 1998). Die Signaltransduktionsmechanismen von AT2R sind sehr verschieden und unterscheiden sich stark von denen des AT1R, nur einige werden derzeit vollständig verstanden. Eine wichtige Rolle in AT2R vermittelten Effekten spielen Protein-Phosphatasen. Ein stimulierter AT2R aktiviert eine Protein-Phosphotyrosin-Phosphatase (PTPase), welche ausschlaggebende Bedeutung bei der Verhinderung von unerwünschtem Wachstum in normalem Gewebe hat. Entscheidenden Einfluss hat AT2R auf MAP-Kinasen-Signal-kaskaden. Als Folge externer Einflüsse auf eine Zelle z. B. durch Hormone, Wachstumsfaktoren oder Stress werden diese Signalketten aktiviert und starten eine überlappende Regulation von Transkriptionsfaktoren. AT2R hat vor allem hemmenden Einfluss, so aktiviert AT2R MAP-Kinase-Phosphatase 1 (MKP-1), die eine Gegenregulation der Wachstumsfaktor-vermittelten Zellproliferation bewirkt. Ebenfalls inaktiviert AT2R ERK1 und ERK2. AT2R aktiviert neben MKP-1 auch die Protein-Phosphatase 2A (PP2A) und die *SH2-domain containing phosphatase 1* (SHP-1), welche unter anderem Moleküle dephosphorylieren, die vom AT1R stimulierte Kinasen phosphorylieren. Auf dieser Ebene erfolgt also eine Rückwärtshemmung der Effekte vom AT1R (Kaschina und Unger, 2003). Ein weiterer, wichtiger Signaltransduktionsweg scheint die AT2R gekoppelte Induzierung des Kinin/NO/cGMP Systems zu sein. Über eine mögliche Aktivierung von

Bradykinin-Rezeptoren kommt es zu vermehrter Bildung von NO und zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). Das cGMP vermittelt als *second messenger* viele der biologischen Aktionen von NO wie Vasodilatation, Natriurese und Wachstumshemmung und Differenzierung durch Aktivierung von cGMP abhängigen Proteinkinasen.

(Kaschina und Unger, 2003). Der AT2R ist ebenfalls bei den Vorgängen der Apoptose beteiligt. Bei der AT2R-induzierten Apoptose werden vermehrt Ceramide gebildet. Die Ceramide induzieren den Zelltod durch die Aktivierung von Stresskinasen oder Caspasen, wie Caspase 3. In Zellen neuronaler oder vaskulärer Herkunft aktiviert AT2R ein *zincfinger homoeo-domain enhancer binding protein gene* (Zfhep) (De Gasparo et al., 2000). Dieses Gen kodiert Transkriptionsfaktoren, welche Vorgänge der Zelldifferenzierung regulieren. Unter experimentellen Bedingungen konnten die antiproliferativen und differenzierenden Effekte von AT2R beschrieben werden (Kaschina und Unger, 2003).

1.5.3.2 Vorkommen und Physiologie

Der AT2R ist im fötalen Gewebe weit verbreitet, nach der Geburt nimmt die Expression stark ab, außer in einigen Organen, wie in Gehirn, Nebenniere, Niere, Myometrium und Ovar. Obwohl von den Angiotensin II-Rezeptoren der AT1R im erwachsenen Organismus unter physiologischen Bedingungen eine größere Rolle zu spielen scheint, wird unter pathologischen Bedingungen vermehrt AT2R gebildet, vor allem bei Gefäßverletzungen, Myokardinfarkt, Nierenversagen, Gehirnischämie und bei Durchtrennung des Ischias oder des Nervus opticus. Auf zellulärer Ebene ist AT2R am programmierten Zelltod beteiligt (Kaschina und Unger, 2003). *Eine in vivo*-Studie zeigt eine AT2R-vermittelte Gefäßrückbildung durch Apoptose von glatten Muskelzellen (Tea et al., 2000). Auch in Zellkulturen von Mausembryofibroblasten, humanen Endothelzellen und humanen fötalen Nebennierenzellen konnte das Zellsterben AT2R-vermittelt induziert werden (Kaschina und Unger, 2003). Während der AT1R Zellproliferation stimuliert, unterdrückt der AT2R Zellwachstum und fördert die Zelldifferenzierung. Der antiproliferative Effekt des AT2R wurde erstmals von Stoll und Koautoren in koronaren Endothelzellen *in vitro* beobachtet (Stoll et al., 1995). Mehrere Studien zeigten bei verschiedenen Zelltypen die antiproliferativen Effekte von AT2R (Munzenmaier und Greene, 1996, Laflamme et al., 1996). Untersuchungen an Tiermodellen berichten, dass es nach einer Stimulation von AT2R in Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten

zu einer Proliferationshemmung und einer Reduktion von extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin und Kollagen I kommt. Die genauen Mechanismen sind hierbei unklar. Ein weiterer AT2R-geförderter Effekt ist die Differenzierung von Zellen. Dies wurde von Zellen neuronalen Ursprungs wie PC12W und von glatten Gefäßmuskelzellen berichtet (Kaschina und Unger, 2003). Die starke Expression von AT2R in der Embryogenese verweist auf eine bedeutende Beteiligung des Rezeptors an Regulation von Proliferation und Zelldifferenzierung. Die Expression erreicht ihren Höhepunkt in der Spätphase der Embryogenese, somit könnte AT2R eine besondere Rolle bei der Entwicklung des Gefäßsystems spielen. Trotz der hohen Expressionsrate während der Embryonalentwicklung zeigen AT2R-*knockout*-Mäuse keinen auffälligen Phänotyp, sondern nur ein leicht verringertes Durstempfinden und einen leicht erhöhten Blutdruck. Nach einer Ang II-Infusion erfolgt bei Abwesenheit von AT2R ein verstärkter Blutdruckanstieg (Hein et al., 1995). AT2R scheint regulierend auf das Blutdrucksystem zu wirken. Pathologische Bedingungen, die mit einem Gewebedefekt einhergehen, wie z.B. Myokardinfarkt, Hirninfarkt, Nervenläsionen oder Verletzungen der Haut, führen zu einer verstärkten Expression des AT2R. In bestimmten Geweben ist AT2R nur unter diesen pathologischen Gegebenheiten nachweisbar (De Gasparo et al., 2000). Zusammenfassend ist festzustellen, dass AT2R an verschiedenen physiologischen und pathologischen Vorgängen beteiligt ist. Der AT2R scheint vor einer Überstimulation durch den AT1R zu schützen. Eine negative Beeinflussung zwischen AT1R und AT2R könnte es auf funktioneller Ebene und über intrazelluläre Signalwege geben (Kaschina und Unger, 2003).

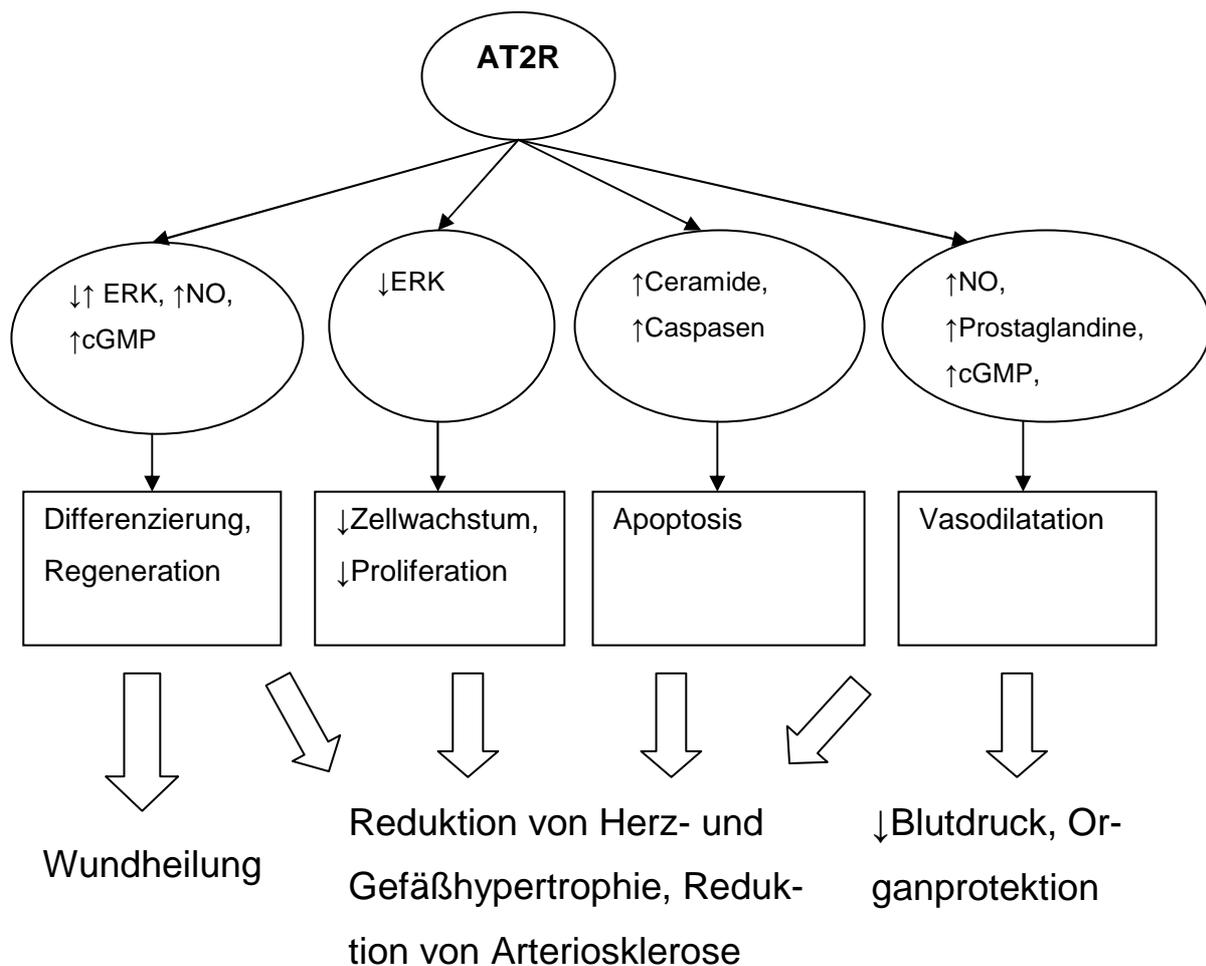


Abbildung 2: AT2R-vermittelte Signalwege und Effekte. Abkürzungen: ERK, *extracellular signal - regulated kinase*; PKC, Proteinkinase C; NO, Stickstoffmonoxid; cGMP, zyklisches Guanosinmonophosphat (nach Kaschina und Unger, 2003)

1.5.4 Mas-Rezeptor

Das Mas-Rezeptor-Gen befindet sich auf Chromosomen 6 in q25.3-q26. Das Mas-Rezeptor-Gen kodiert Zelloberflächenproteine mit 7 transmembranären Domänen und einer generellen Ähnlichkeit zur Familie der G-Proteinrezeptoren, in der Literatur werden diese Proteine als Mas- oder als Angiotensin(1-7)-Rezeptoren bezeichnet (Ambroz et al., 1991).

Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE 2), ein Homolog zu ACE, bildet Ang(1-7), welches als Ligand für den Mas-Rezeptor fungiert. Somit gehört der Mas-Rezeptor im engeren Sinne nicht zu den Ang II-Rezeptoren, sondern bildet eine parallele Achse zu den Signalketten von ACE und Ang II (Santos und Ferreira, 2007). In dieser Arbeit wurde der Mas-Rezeptor berücksichtigt, da er wichtige regulierende Funktionen im komplexen LAS übernimmt. Unser Wissen über Struktur, Regulation und Signalwege des Mas-Rezeptors ist noch begrenzt, weshalb des weiteren versucht wird, einen knappen Überblick über den aktuellen Wissenstand zu gegeben.

1.5.4.1 Signalmechanismen

Beim Mas-Rezeptor ist der endogene Ligand nicht bekannt, er gehört somit zur Gruppe der *Orphan-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren*. Viele Details der Signalketten des Mas-Rezeptors sind somit noch ungeklärt. In Zellkulturen wurde die Freigabe von Arachidonsäuren durch Mas-Rezeptor-transfizierte Zellen beobachtet (Santos et al., 2003). Ang(1-7) stimuliert in diesen Zellen ebenfalls die Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS), die zur Freisetzung von NO führt. Ein wichtiger Mas-Rezeptor vermittelter Effekt von Ang(1-7) ist die Hemmung der Phosphorylierung von MAP-Kinasen. So wurde in Ratten-Kardiomyocyten die Inhibition von ERK 1/2 beobachtet (Tallant et al., 2005). Weiterhin schwächt Ang(1-7) signifikant die Ang II-induzierte Bildung von ROS ab (Santos und Ferreira, 2007).

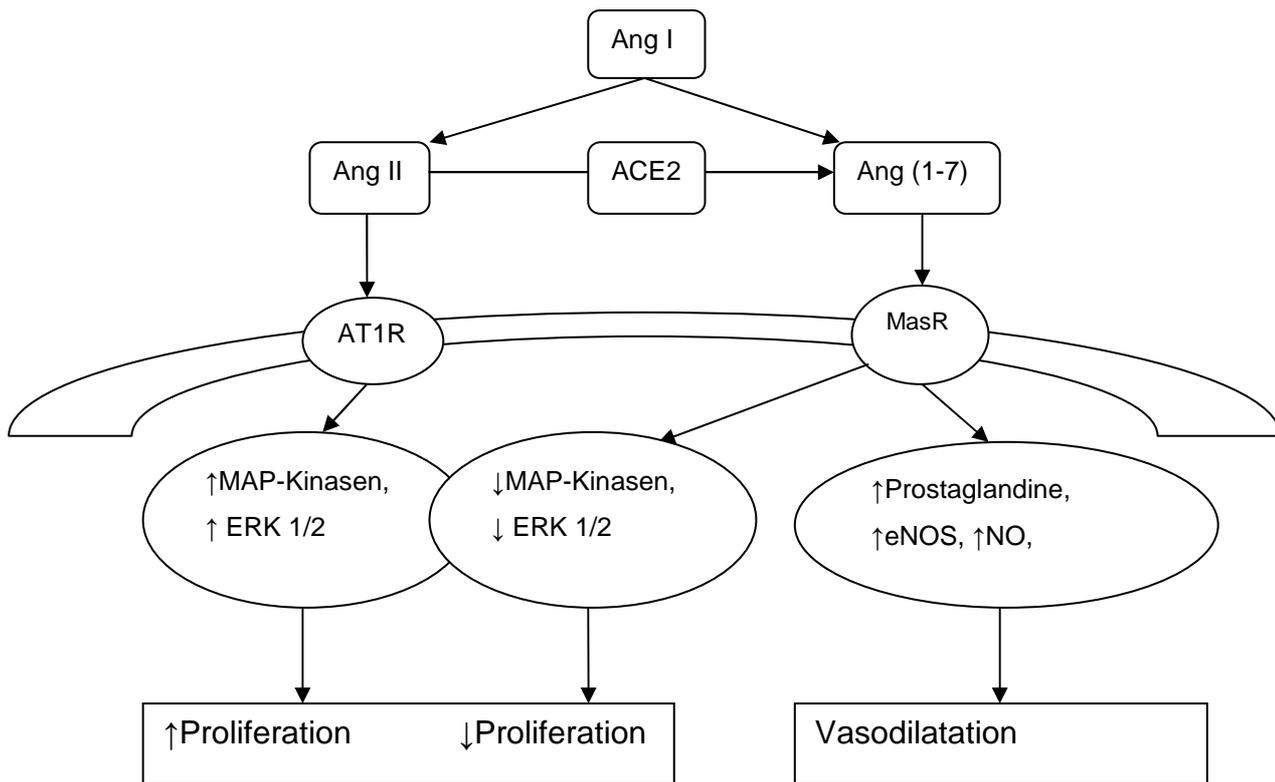


Abbildung 3: Mas-Rezeptor vermittelte Signalwege und Effekte. Abkürzungen: Ang I, Angiotensin I; Ang II, Angiotensin II, ACE 2, Angiotensin-Converting-Enzym 2; Ang(1-7), Angiotensin(1-7); MasR, Mas-Rezeptor; MAP-Kinase, Mitogen-aktivierte Proteinkinase; ERK, *extracellular signal - regulated kinase*; eNOS, endotheliale NO-Synthase; NO, Stickstoffmonoxid (nach Santos und Ferreira, 2007)

1.5.4.2 Vorkommen und Physiologie

Der Mas-Rezeptor wurde vor allem im Herz, den Blutgefäßen und in der Niere beschrieben. Eine der wichtigsten Aufgaben des Mas-Rezeptors betrifft die Herzfunktion. Inzwischen ist klar, dass diese im Angiotensin-System über zwei gegenläufige Wege gesteuert wird: die ACE-Ang II-AT1R/AT2R-Achse und die ACE2-Ang(1-7)-Mas-Rezeptor-Achse. Da eine chronische Zunahme von Ang II viele beeinträchtigende Effekte auf die Herzfunktion haben kann, erfüllen Ang(1-7) und der Mas-Rezeptor eine kardioprotektive Rolle. Der stimulierte AT1R führt zu Herzumbauvorgängen, welche mit Hypertrophie, nachlassender Herzleistung und ansteigendem Infarktrisiko vergesellschaftet sind. Dagegen reduziert oder verhindert der aktivierte Mas-Rezeptor struktu-

relle Veränderungen am Herzen durch Herabsetzen von Hypertrophie und Fibrose (Santos und Ferreira, 2007).

Ang(1-7) kann in der Gefäßwand aus Ang I oder Ang II gebildet werden. Im menschlichen Endothel sind ACE-abhängige und ACE-unabhängige Signalketten beschrieben worden. Die größte Rolle scheint die Bereitstellung über ACE 2 zu spielen. Nach anschließender Aktivierung des Mas-Rezeptors im Endothel, wird die Produktion von NO, Prostaglandinen und *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) stimuliert, welche eine Gefäßdilatation herbeiführen. Die Wirkungen des Mas-Rezeptors in der Gefäßwand sind nicht auf das Endothel beschränkt, so gibt es antiproliferative Effekte im fibrovasculären Gewebe, in den glatten Gefäßmuskelzellen und bei Stent-induzierter Neointimaprolieration. Weiterhin inhibiert Ang(1-7) Gefäßwachstum durch Steigerung von Prostaglandin-vermittelten Zellaktivitäten, welche Freisetzung von cAMP und Reduktion von ERK 1/2-Aktivitäten beinhalten (Santos und Ferreira, 2007).

Die Niere ist ebenfalls ein Hauptziel für Aktivitäten von Ang(1-7) und Mas-Rezeptor. Ang(1-7) erreicht in der Niere eine vergleichbare Konzentration mit Ang II und führt zu komplexen renalen Effekten. In Tierversuchen wurde die Förderung von Antidiurese durch Ang(1-7) beobachtet (Magaldi et al., 2003, Pinheiro et al., 2004). Mas-Rezeptor-mRNA wurde in proximalen Tubuluszellen gefunden, in welchen durch Ang(1-7) die Ang II induzierte Phosphorylierung von MAP-Kinase inhibiert wird. Dies könnte ein Hinweis auf mögliche renalprotektive Effekte von Ang(1-7) und Mas-Rezeptor sein (Santos und Ferreira, 2007).

1.6 Das Angiotensin II-System und Tumorentwicklung

Neben den klassischen Rollen von Ang II als ein Hauptregulator von Blutdruck und kardiovaskulärer Homöostase, beeinflusst Ang II Zellproliferation und Migration, wichtige Vorgänge bei Tumorwachstum und Metastasierung. Verschiedene experimentelle Modelle zur Angiogenese liefern Hinweise, dass Ang II ebenfalls an der Tumorentwicklung beteiligt ist.

1.6.1 Pathophysiologie

1.6.1.1 Expression

Neuere Studien berichten von der lokalen Expression verschiedener Komponenten des RAS in verschiedenen Tumorzellen und Geweben, wie Hirntumor, Lungen- und Pankreaskrebs sowie in Brust-, Prostata-, Haut- und Zervixkarzinomen (Deshayes und Nahmias, 2005). Alle Komponenten des RAS sind im humanen Glioblastom vorhanden (Juillerat-Jeanneret et al., 2004). ACE wird hauptsächlich in Tumorblutgefäßen exprimiert (Juillerat-Jeanneret et al., 2004), AT1R ist überexprimiert in Brusthyperplasien und im *duktalen carcinoma in situ* (DCIS) und fehlt in invasiven Mammakarzinomen (De Peape et al., 2001). AT2R-Proteine und mRNA werden in nichtneoplastischen Brustgewebszelllinien nur schwach nachgewiesen, nehmen aber in Hyperplasie, DCIS und invasivem Brustkrebs zu (De Peape et al., 2002). AT1R ist ebenfalls im Plattenepithelkarzinom der Haut abhängig vom Differenzierungsgrad überexprimiert. In menschlichen Zervikal- und Ovarialkarzinomen korreliert die AT1R-Überexpression mit der Tumordinvasion. Eine ansteigende AT1R-mRNA-Expression wurde im Prostatakarzinom im Vergleich zu normalen Prostatagewebe gefunden. Im Gegensatz dazu wurde immunhistochemisch in der Prostatahyperplasie eine Herabregulierung von AT1R und ein Anstieg von ACE und Ang II beschrieben (Deshayes und Nahmias, 2005).

ACE ist auch in der Lage, das vasoaktive Peptid Bradykinin abzubauen, welches andere Peptidasen zu Auf- und Abbau von Ang II stimulieren kann. Mastzell-Chymase generiert ACE-unabhängig lokal Ang II. Ang(1-7) inhibiert die Proliferation von Lungenkrebszellen ohne die Beteiligung von AT1R und AT2R. Aminopeptidase A und *adipocyte-derived leucine aminopeptidase* (A-LAP) spalten Ang II auf und werden in Endometriumkarzinomen zusammen mit Ang II und AT1R exprimiert. Eine Überexpression

dieser Peptidasen in Uteruskarzinomen führt zu reduziertem Tumorwachstum und Angiogenese sowie zu niedriger *vascular endothelial growth factor* (VEGF)–Konzentration. Diese verschiedenen Beobachtungen zeigen den Einfluss von lokal exprimierten Bestandteilen des Ang II-Systems auf Tumorwachstum und Entwicklung (Deshayes und Nahmias, 2005).

1.6.1.2 ACE

Verschiedene Studien beschreiben den tumorprotektiven Einfluss von ACE-Inhibitoren. Erstmals berichtete Lever et al. von einem herabgesetzten Tumorrisiko bei einer Langzeitbehandlung mit Captopril, Lisinopril und Enalapril bei Brust- und Lungenkarzinomen (Lever et al., 1998). Nachfolgende epidemiologische Langzeitstudien zeigten sehr unterschiedliche Ergebnisse, wahrscheinlich bedingt durch die Vielzahl von verschiedenen ACE-Inhibitoren, unterschiedlichen Patientenkollektiven, Unterschieden in Compliance, Dosierung und Dauer der Untersuchungen (Lindholm et al., 2001, Friis et al., 2001, Li et al., 2003). Eine andere Studie sieht einen Zusammenhang zwischen ACE-Konzentration und Tumorrisiko bei Brustkrebs. Hierbei wurde beobachtet, dass die ACE-Plasmakonzentration von einem Insertions-/Deletions-Polymorphismus des ACE-Gens abhängig ist: Die ACE-Plasmakonzentration ist bei homozygoten Trägern des I-Allels halb so groß wie bei homozygoten Trägern des D-Allels. Eine Herabregulation des ACE erniedrigt das Tumorrisiko bei Trägern des II-Allels, im Vergleich zu Trägern des DD-Allels mit hoher ACE-Aktivität (Koh et al., 2003).

1.6.1.3 Tumorwachstum und Angiogenese

Die Rolle von AT1R in Tumorwachstum und Angiogenese wurde mit Hilfe von Candesartan, einem potenten AT1-Antagonisten, im Mausmodell untersucht. Candesartan reduziert die Größe und Vaskularisation von transplantierten syngen Sarkomen und reduziert die Anzahl von Lungenmetastasen von 3LL-Karzinomen (Fujita et al., 2002). Ähnliche Beobachtungen gibt es bei Mäusemelanomen (Egami et al., 2003) sowie bei Xenograftmodellen von menschlichen Prostata- und Ovarialkarzinomen (Suganuma et al., 2005, Uemura et al., 2003). Diese Ergebnisse suggerieren, dass eine Blockade von AT1R eine effektive Antikrebstherapie sein könnte. Ebenfalls könnte die Expression von

AT1R in Endothelzellen neben den Tumorzellen ein Indiz für Tumorangiogenese sein (Fujita et al., 2002).

1.6.1.4 AT2R und Mas-Rezeptor

Die Funktion von AT2R und Mas-Rezeptor bei Tumorwachstum und Angiogenese wurde in bisherigen Studien nicht direkt untersucht. Eine Langzeitblockade durch AT1R-Antagonisten lässt aber AT2R aktiviert und in den meisten pathologischen Situationen sowie in einigen experimentellen Modellen zur Angiogenese, steuert der aktivierte AT2R den Effekten von AT1R entgegen. Auch der Mas-Rezeptor agiert ACE-unabhängig gegenregulatorisch zu AT1R. Aus diesen Erkenntnissen, könnte man die Schlussfolgerung ziehen, dass AT2R und der Mas-Rezeptor einen indirekten hemmenden Effekt auf das Tumorwachstum ausüben (Deshayes und Nahmias, 2005).

1.6.1.5 AT1R und Tumorumgebung

Es ist bekannt, dass neoplastische Zellen von ihrer unmittelbaren Umgebung beeinflusst werden. Zwei verschiedene Studien haben die Rolle von AT1R in der Umgebung von Tumoren in Bezug auf Tumorwachstum und Angiogenese untersucht (Egami et al., 2003; Fujita et al., 2005). Hierbei wurden syngene Tumorzellen subkutan bei Wildtyp und AT1R-*knockout*-Mäusen injiziert. Die Ergebnisse unterstreichen den Einfluss von wirtseigenen AT1R auf Tumorwachstum und Angiogenese. So wurden hohe Konzentrationen von AT1R in der Umgebung des Tumors gefunden, diese fördern Tumovaskularisation und VEGF-Synthese (Fujita et al., 2005). Eine andere unerwartete Erkenntnis war die hohe Expression von AT1R in tumorassoziierten Makrophagen. Diese Makrophagen und die damit verbundene hohe Konzentration von VEGF, waren in AT1R-Null-Mäusen stark reduziert. Dies könnte bestätigen, dass AT1R an der entzündungsbedingten Tumorangiogenese beteiligt ist (Egami et al., 2003).

Unbestritten spielen Entzündungsvorgänge bei Tumorentstehung, Entwicklung und Metastasenbildung eine bedeutende Rolle und Ang II ist neben der direkten Beeinflussung des Tumors an vielen verschiedenen Entzündungsprozessen beteiligt. Peptidasen, wie ACE und Chymase werden von Makrophagen und Mastzellen freigesetzt, AT1R und AT2R regulieren die Synthese von Pro-Entzündungsmediatoren in beiden

Zelltypen. AT1R unterdrückt außerdem die Endothel-adhäsiven Moleküle E-Selektin, P-Selektin und VCAM-1 und ermöglicht so die Infiltration von Entzündungszellen und metastasierenden Tumorzellen (Deshayes und Nahmias, 2005).

1.6.1.6 Signalwege

Die Signalketten von AT1R und AT2R greifen in Tumor-relevante Prozesse, wie Wachstum, Angiogenese und Entzündung ein. Folgende Wirkungskaskaden wurden besonders in Bezug auf Tumorzellen beschrieben.

AT1R induziert bei Tumorzellen die Zellproliferation. AT1R aktiviert EGFR in Prostata (Uemura et al., 2003) und Brustkarzinomzellen (Greco et al., 2003), welche über ERK zur Aktivierung von STAT3 und PKC führen. Die Koaktivierung von EGFR ist zum Teil relevant für Tumorzellen, da eine EGFR-Verstärkung häufig mit Tumorprogression verbunden ist. Neuere Studien haben eine neue Familie von AT2R-interagierenden Proteinen (ATIP) gefunden, welche die EGF-induzierte Zellproliferation hemmen (Nouet et al., 2004 und Wruck et al., 2005).

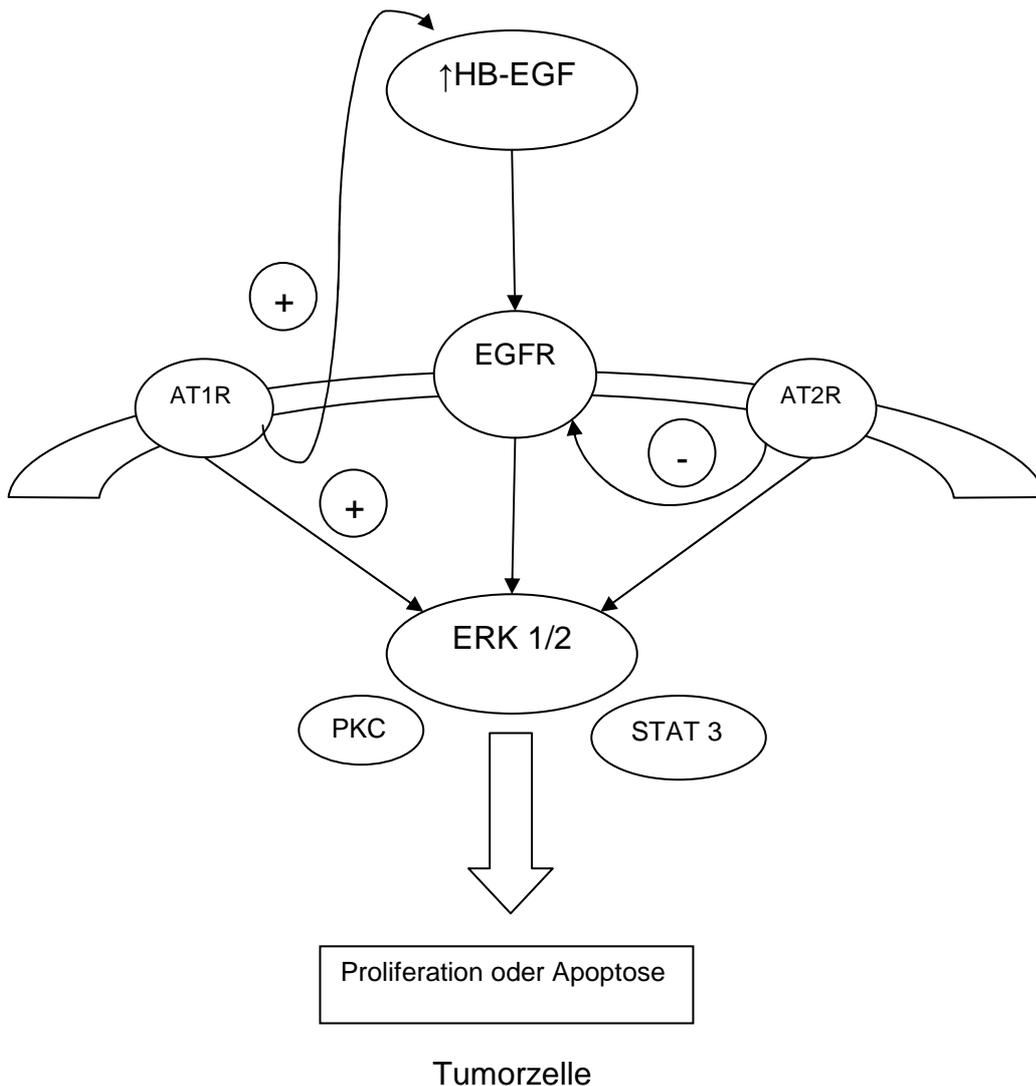


Abbildung 4: Signalwege mit Einfluss auf Tumorprogression. Abkürzungen: ERK, *extracellular signal-regulated kinase*; EGFR, Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor; HB-EGF, Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor; PKC, Proteinkinase C; STAT 3, *signal transducers and activators of transcription 3* (nach Deshayes und Nahmias 2005)

Wie in Absatz 1.6.1.3 beschrieben, spielt die tumorassoziierte Angiogenese eine bedeutende Rolle in der Tumorentwicklung und Ausbreitung, folgende Signalketten sind hauptsächlich bei diesen Vorgängen beteiligt. Die proangiogenetischen Effekte von AT1R resultieren meist in der Verstärkung der VEGF-Wirkung auf Endothelzellen. AT1R sorgt für die Zunahme der Expression von VEGF-Rezeptor Typ 2 (VEGF-R2) und Angiotensin-2, einen Hauptakteur der *Tie-2 receptor tyrosine kinase*-assoziierten Angiogenese. Im mikrovaskulären Endothel reguliert AT1R die VEGF- und Angiotensin-2-Konzentration über eine Koaktivierung von EGFR hoch. AT2R steuert aber mit einer

Hemmung der EGFR-Autophosphorylierung gegen. AT1R führt im mikrovaskulären Gewebe zu antiapoptotischen Effekten. Dies geschieht durch Hochregulierung von Survivin und Hemmung der Caspase 3-Aktivität über eine Stimulierung des Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3K/Akt)-Signalwegs. Im Gegensatz inhibiert AT2R die VEGF-R2-induzierte Phosphorylierung von PI-3K/Akt und eNOS, was auch zu einer verringerten Migration führt (Deshayes und Nahmias, 2005).

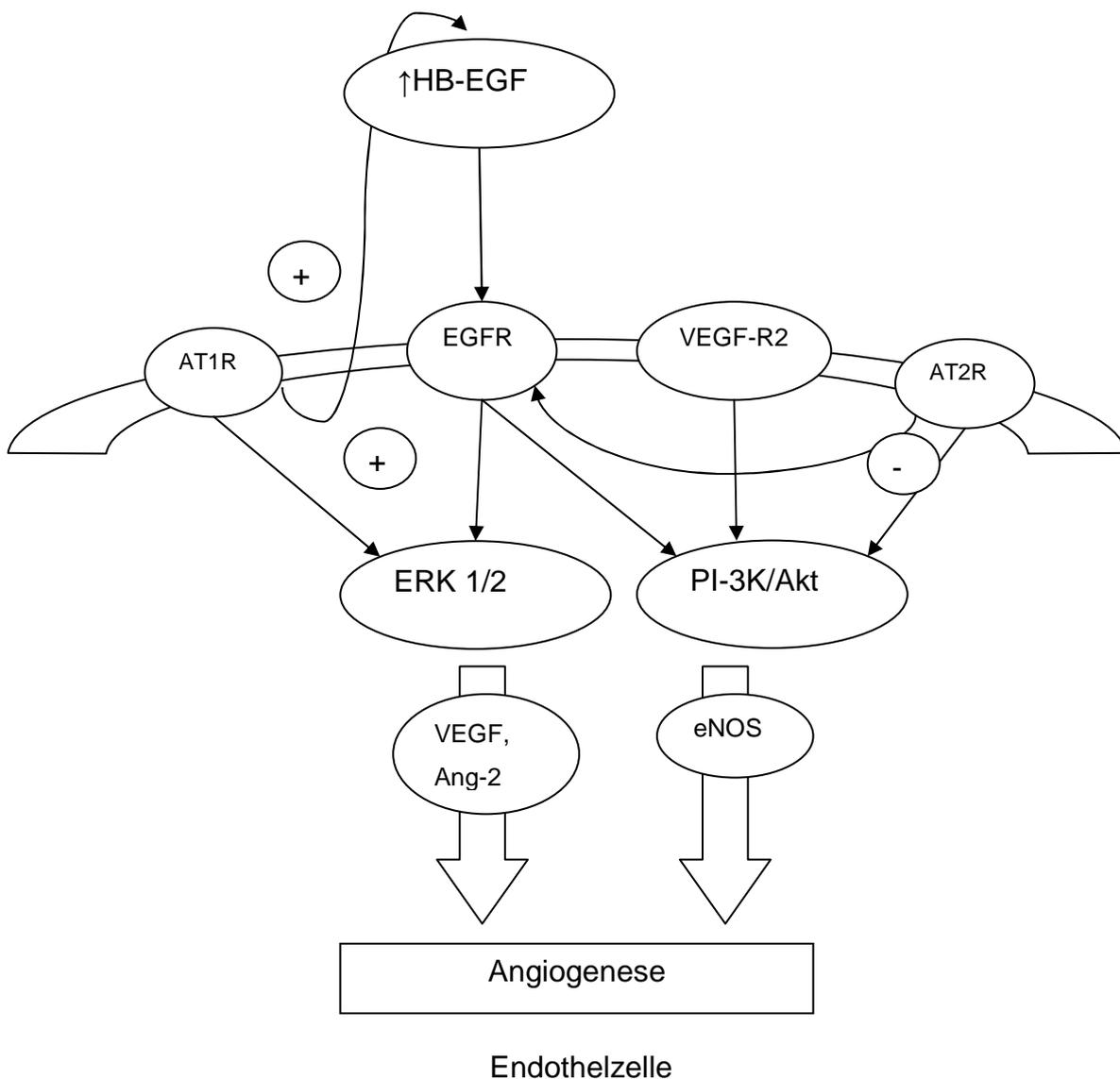


Abbildung 5: Signalwege mit Einfluss auf Angiogenese. Abkürzungen: ERK, *extracellular signal - regulated kinase*; EGFR, Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor; HB-EGF, Heparin-bindender epidermaler Wachstumsfaktor; VEGF, *vascular endothelial growth factor*; VEGF-R2, VEGF-Rezeptor Typ2; Ang-2, Angiotensin-2; eNOS, endotheliale NO-Synthase; PI-3K/Akt, Phosphoinositid-3 Kinase (nach Deshayes und Nahmias 2005)

1.6.2 Das lokale Angiotensin-System im Magenkarzinom

Vorangehende Untersuchungen haben Hinweise geliefert, dass das LAS auch beim Magenkarzinom eine Rolle spielen könnte. Zunächst konnte in einer Studie gezeigt werden, dass der Insertions-/Deletions-Polymorphismus des ACE-Gens mit dem Nodalstatus und dem UICC-Tumorstadium des Magenkarzinoms korreliert (Röcken et al.,

2005). Patienten mit einem II-Genotyp wiesen signifikant weniger Lymphknotenmetastasen und ein niedrigeres UICC-Tumorstadium auf, als Patienten mit einem *DD*-Genotyp. In einer Folgestudie konnte nachgewiesen werden, dass der Nodalstatus des Magenkarzinoms außerdem mit der Expression des AT1R korreliert (Röcken et al., 2007). Hierbei zeigte sich, dass die AT1R-Expression, vor allem beim intestinalen Typ, hoch signifikant mit der Anzahl der Lymphknotenmetastasen und dem UICC-Tumorstadium assoziiert ist. Der Genotyp und der AT1R-Status erwiesen sich dabei als unabhängige Risikofaktoren für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen. Patienten mit einem ID- oder DD-Genotyp und AT1R+ Tumorzellen weisen ein hohes Risiko für das Auftreten von Lymphknotenmetastasen auf (Röcken et al., 2007).

1.6.3 Fragestellung

Basierend auf den o.g. Erkenntnissen geht die vorliegende Dissertation von der Hypothese aus, dass das LAS die Tumorprogression und Lymphknotenmetastasierung von Magenkarzinomen beeinflusst und deshalb eine potentielle diagnostische und therapeutische Zielstruktur ist. Da aber Therapieentscheidungen oft schon an Hand tumorhaltiger Biopsate getroffen werden, sollten mit der hier beschriebenen Studie, folgende Fragen beantwortet werden:

1. Korreliert die Expression der Angiotensin II-Rezeptoren Typ 1 und 2 sowie des Mas-Rezeptors im Biopsat mit der Expression im korrespondierenden Tumorsektat?
2. Korreliert der Nachweis der Angiotensin II-Rezeptoren Typ 1 und 2 sowie des Mas-Rezeptors im Biopsat mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika, die am Resektat erhoben werden?

Die Beantwortung dieser Fragen würde wichtige Aussagen zur prognostischen und prädiktiven Wertigkeit des Rezeptornachweises am Biopsat liefern und hätte unmittelbare klinische Relevanz.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde ein Patientenkollektiv ausgewählt, bei dem vom selben Patienten sowohl Biopsate als auch Resektate des Magenkarzinoms vom intestinalen Typ vorlagen.

2. Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Für diese Untersuchung wurden 1300 histologische Befunde von Patienten mit einem Magenkarzinom aus dem Archiv des Instituts für Pathologie der Charité Berlin geprüft. Schließlich wurden nur Fälle mit dem histologischen Typ des intestinalen Adenokarzinoms nach Laurén berücksichtigt. Diese 251 Patientenfälle wurden in Bezug auf vorhandene Vorbefunde mit verfügbarem fixiertem Gewebe geprüft. Nach anschließender mikroskopischer Sichtung musste festgestellt werden, dass ein Großteil des Archivmaterials nicht verfügbar war. Somit verblieb ein Untersuchungskollektiv von 35 Patienten, die in einem Zeitraum von 1995-2006 in der Charité operiert wurden, 20 von 35 wurden total- und 15 von 35 wurden teilgastrektomiert. Bei allen Patienten erfolgte eine Voruntersuchung mit Biopsatentnahme. Die Proben bestehen aus in 10%igem Formalin-fixierten, paraffineingebetteten Gewebelöcken von Resektionen und den korrespondierenden Biopsaten. Die Stadieneinteilung der Magenkarzinome erfolgte nach der 6. Auflage der TNM-Klassifikation der UICC von 2003. Aus Datenschutzgründen wurden die Patientendaten pseudonymisiert.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

100%iges Ethanol wurde bei der Firma Herbeta Arzneimittel, Berlin, und Xylol bei der Firma Merck, Darmstadt bezogen. Trizma® base, T6066-1KG, 1% Tween® 20, p9416-100ML und Bovine Serum Albumin (BSA), 9048-46-8, stammen von der Firma Sigma-Aldrich Co., Steinheim. Von der CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe wurde Natriumchlorid (NaCl), 3957.1, Zitronensäure, 1818.1 und Natriumcitrat, 3580.1, bezogen. Der Antibody Diluent, Ref zu C025-500, stammt von Zytomed. Berlin und die Hämaunlösung sauer nach Meyer, H 02-1000, von Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig. Der AVIDIN/BIOTIN BLOCKING KIT, SP-2001, wurde bei Vector Laboratories, Inc., Bur-

lingame, USA und Immu Mount™, Ref 9990412, von der Firma Thermoscientific, Pittsburgh, USA bezogen.

2.2.2 Geräte

Paraffinschnitte wurden mit einem Schlittenmikrotom hergestellt (HM 400R, Microm GmbH, Walldorf). Das Paraffinstreckbad war das Tissue Flotation Bath, TFB 45, von Medite Medizintechnik, Nunningen, Schweiz. Die Trocknung der Paraffinschnitte erfolgte in einem Brutschrank, B28#04-68149, von BINDER, Tuttlingen.

Die hitzeinduzierte Antigendemaskierung wurde in einer Mikrowelle, NN-K 105W von Panasonic durchgeführt. Sämtliche Titrationsen geschahen mit einem Calibration Check Microprocessor pH-Meter, HI 221, von HANNA INSTRUMENTS, Woonsocket, U.S.A. Sonstige Laborgeräte, die während der immunhistochemischen Färbungen verwendet wurden, umfassen einen Wippschüttler, PMR-30, Grant-bio, Cambridgeshire, Großbritannien, einen Rüttler, 444-1372, VMR, Darmstadt, und einen Mini-Magnetrührer 1000, CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe.

Die Auswertung der Färbungen erfolgte an einem Mikroskop, Eclipse E200, von Nikon, Tokyo, Japan.

2.2.3 Antikörper

Für die immunhistochemische Färbung wurden polyklonale Primärantikörper als spezifisches IgG vom Kaninchen für den AT1R, den AT2R und den Mas-Rezeptor verwendet.

Die IgG-gereinigten Kaninchen anti-AT1R- und IgG-gereinigten Kaninchen anti-AT2R-Antikörper wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Stefan Schulz, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Jena, zur Verfügung gestellt. Der IgG-gereinigte Kaninchen-anti-Mas-Rezeptor-Antikörper wurde von Prof. Dr. rer. nat. Uwe Lendeckel, Institut für Medizinische Biochemie und Experimentelle Molekularbiologie, Universität Greifswald, zur Verfügung gestellt.

2.2.4 Färbekits

Der Nachweis von AT1R und des Mas-Rezeptors erfolgte mit dem LSAB+System-AP Kit, Code K 0678, Dako, Glostrup, Dänemark.

Der Nachweis von AT2R erfolgte mit dem Dako Real™ Detection System Alkaline Phosphatase/Red Kit, Code K 5005, Dako, Glostrup, Dänemark.

2.2.5 Puffer

Für die Herstellung eines 1 mM TBS-Puffer wurde zunächst eine Stammlösung hergestellt, indem 60,57 g Trizma ® base und 87,66 g NaCl in 1 l demineralisiertem Wasser (dH₂O) gelöst wurden. Die Einstellung des pH-Werts der Stammlösung erfolgte darauf mit HCl auf 7,4. Für die Gebrauchslösung wurde die Stammlösung 1:10 mit dH₂O verdünnt.

Die Herstellung des 1mM Citrat-Puffers basierte auf zwei Stammlösungen. Für die Stammlösung A wurden 5,25 g Zitronensäure und für die Stammlösung B 7,35 g Natriumcitrat in jeweils 1 l dH₂O gelöst. Die Gebrauchslösung bestand aus 72 ml Stammlösung A und 328 ml Stammlösung B und wurde mit dH₂O auf einen Liter aufgefüllt. Der pH-Wert wurde mit der Stammlösung A auf pH 6 titriert.

2.3 Methoden

2.3.1 Gewebeschnitte

Aus den formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt. Zur Streckung und Entfaltung wurden die Schnitte in ein kaltes Wasserbad gegeben und anschließend in einem Paraffinstreckbad (40 °C) auf SuperFrostPlus-Objektträger (Fa. Langenbrinck, Emmendingen, BRD) aufgezogen. Über Nacht trockneten die Schnitte bei 37 °C in einem Brutschrank.

2.3.2 Immunhistochemische Färbung

Für die immunhistochemische Untersuchung des AT1R, AT2R und Mas-Rezeptors wurde die Avidin-Biotin-Methode mit den oben genannten Kits der Firma Dako verwendet. Sämtliche Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Die Entparaffinierung und Rehydrierung geschah für alle Schnitte in Xylol und der absteigenden Alkoholreihe. Hierbei wurden die Schnitte zuerst zweimal 15 min in Xylol gespült, dann für zweimal 2 min in 100% Ethanol, anschließend einmal in 70% Ethanol. Zum Schluss erfolgten die abschließende Rehydrierung in dH₂O und Spülen für 10 min in TBS-Puffer.

2.3.2.1 AT1R

Zur Steigerung der Sensitivität und zur Demaskierung von eventuell durch die Fixation veränderten Antigenen, wurde eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung durchgeführt. Hierbei kamen die Schnitte für 3 x 5 min bei 600 Watt in die Mikrowelle. Die Vorbehandlung erfolgte in 1mM Citrat-Puffer mit einem pH-Wert von 6. Darauf kühlten die Schnitte für 10 min bei Raumtemperatur ab und wurden anschließend gewässert und für 5 min in TBS-Puffer gespült. Der Primärantikörper wurde nun 1:1000 in TBS-Puffer + 1% BSA verdünnt. Das Gewebe wurde folgend mit ca. 150-200 µl Primärantikörperverdünnung bedeckt und für 60 min inkubiert. Der in der Linklösung enthaltene biotinmarkierte Sekundärantikörper verblieb ebenfalls für 60 min auf dem Gewebe. Nun wurde

das mit alkalischer Phosphatase konjugierte Streptavidin (Streptavidin-AP-Lösung) für 30 min auf den Schnitten appliziert. Zwischen sämtlichen Inkubationsschritten wurde das Gewebe für 3 x 5 min in TBS-Puffer auf dem Wippschüttler gewaschen. Um die Immunreaktion sichtbar zu machen, wurde das im Kit enthaltene, frisch angesetzte Fuchsin-Chromogen für 20 min aufgetragen. Die Schnitte wurden nach ausreichender Färbung mit reichlich dH₂O gespült und über Nacht bei 4 °C entgast. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde Hämalaun sauer nach Meyer verwendet. Das Eindecken der Schnitte erfolgte abschließend mit Immu Mount™.

2.3.2.2 AT2R

Um Reaktionen mit endogenem Biotin im Gewebe auszuschließen, erfolgte als erstes ein jeweils 15 minütiger Inkubationsschritt mit Avidin- und Biotinblocking-Lösung. Der Primärantikörper wurde 1:100 in Antibody Diluent verdünnt und darauffolgend das Gewebe mit ca. 150-200 µl Primärantikörperverdünnung bedeckt und für 60 min inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 30 min mit 2-3 Tropfen Linklösung (Sekundärantikörper) benetzt. Darauf folgte die Applikation der Streptavidin-AP-Lösung für 30 min. Zwischen sämtlichen Inkubationsschritten wurde das Gewebe für 3 x 5 min in TBS-Puffer auf dem Wippschüttler gewaschen. Als letzter Schritt erfolgte die Inkubation mit der frisch angesetzten Substrat-Chromogen-Lösung für 20 min. Die Schnitte wurden nach ausreichender Färbung mit reichlich dH₂O gespült und über Nacht bei 4 °C entgast. Gegenfärbung und Eindecken erfolgten analog des obigen Protokolls.

2.3.2.3 Mas-Rezeptor

Der Primärantikörper wurde 1:200 in TBS-Puffer + 1% BSA verdünnt. Das Gewebe inkubierte für 60 min mit ca. 150-200 µl Primärantikörperverdünnung. Anschließend wurden die Schnitte für 60 min mit 2-3 Tropfen Linklösung (Sekundärantikörper) benetzt. Im nächsten Schritt erfolgte die Applikation der Streptavidin-AP-Lösung für 30 min. Abschließend wurden die Schnitte für 20 min mit der frisch angesetzten Fuchsin-Chromogen-Lösung entwickelt. Nach ausreichender Färbung erfolgte eine Spülung mit reichlich dH₂O. Entgasung, Gegenfärbung und Eindecken geschah analog des ersten Protokolls.

2.3.2.4 Kontrollen

Zur Sicherstellung der spezifischen Reaktion des Primärantikörpers wurde für sämtliche Präparate stets eine Negativkontrolle mitgeführt, bei welcher der Primärantikörper fortgelassen wurde.

Bei der Färbung von AT1R und des Mas-Rezeptors erfolgte, statt des Inkubierens mit dem Primärantikörper ein Durchlauf mit TBS-Puffer + 1% BSA, beim Färben von AT2R wurde mit Antibody Diluent gearbeitet.

Alle Negativkontrollen wurden ansonsten wie die zu untersuchenden Gewebeschnitte behandelt.

Als Positivkontrollen dienten Gewebeproben menschlicher Niere. Hierbei konnten positive Immunreaktionen an den Glomeruli der Niere beobachtet werden.

2.4 Auswertung

Die Auswertung der Präparate erfolgte verblindet.

Die histologische Auswertung berücksichtigte zwei Kategorien, die Intensität der Immunreaktion und die Anzahl der immunreaktiven Tumorzellen im Tumorgewebe, wie in Tabelle 5 dargestellt. Zur Auswertung wurde nur das Tumorgewebe betrachtet.

Tabelle 5:

Kategorie A - Intensitäts-Score:

0	keine Färbung
1	schwache Färbung
2	deutliche Färbung
3	starke Färbung

Kategorie B – Verteilungs-Score:

0	keine Färbung
1	1-20 % positive Tumorzellen
2	21-50 % positive Tumorzellen
3	51-80 % positive Tumorzellen
4	81-100 % positive Tumorzellen

Durch die Addition, der für Kategorie A und B ermittelten Werte, konnte für jede Probe ein Immunreaktivitäts-Score (IRS) gebildet werden. Die möglichen Werte betragen: 0, 2, 3, 4, 5, 6 und 7.

Weiterhin wurde noch die Lokalisation der Immunreaktion, d.h. membranständig oder zytoplasmatisch, dokumentiert.

2.5 Statistik

Die ermittelten Datensätze wurden folgendermaßen statistisch ausgewertet. Als erstes erfolgte der Vergleich der Expression der jeweiligen Rezeptoren in Resektat und Biopsat. Die Untersuchungen erfolgten mit dem Cohens Kappa-Vergleich und Fishers exaktem Test.

Desweiteren wurde eine eventuelle Korrelation der Expression der Angiotensin II-Rezeptoren mit den klinisch pathologischen Parametern untersucht. Hierbei wurde geprüft ob es einen statistischen Zusammenhang zwischen der Rezeptorexpression und nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen gibt. Dabei erfolgte eine Untersuchung mit einer N+Gruppe, diese beinhaltet alle Fälle mit befallenen Lymphknoten, im Vergleich zur N-Gruppe mit Fishers exaktem Test. Außerdem wurden die einzelnen N-Kategorien ebenfalls in Gruppen (N0, N1, N2, N3) nach dem Chi²-Test von Pearson mit der Rezeptorexpression verglichen. Auf eine statistische Berücksichtigung der T- und M-Kategorien wurde wegen der begrenzten Datenmenge verzichtet.

Im Anschluss wurden die membranständigen und zytoplasmatischen Rezeptornachweise ebenfalls hinsichtlich ihres Vorkommens in Resektat und Biopsat und in Bezug auf die N-Kategorie analog der obigen Untersuchungen überprüft.

Zusätzlich wurde kontrolliert, ob auch der IRS mit den verschiedenen klinisch-pathologischen Variablen korreliert. Es wurden mehrere Cut-off-Werte (Tab. 6) gebildet und mit den oben genannten statistischen Methoden untersucht. Da die Beurteilung der schwachgefärbten und gering verteilten Immunreaktionen besonders von subjektiven Betrachtungen belastet ist, wurden zur Bewertung der Expression der einzelnen Angiotensin-Rezeptoren Cut-off-Werte von 0 bis 3 berücksichtigt. Die statistische Auswertung bei der Unterscheidung in membranständige und eine zytoplasmatische Expression erfolgte orientierend mit den Cut-off-Werten von 0 und 3.

Tab. 6: Einteilung der einzelnen Cut-off-Werte

	IRS negativ	IRS positiv
Cut-off 0	IRS=0	IRS=1-7
Cut-off 2	IRS=0-2	IRS=3-7
Cut-off 3	IRS=0-3	IRS=4-7

Die Mehrzahl der ermittelten Scores ergaben ein Resultat von 4 und aufwärts, somit wurde auf Cut-off-Werte höher als 3 verzichtet.

Die Berechnungen erfolgten mit der Statistiksoftware SPSS, Version 16.0. (Chicago, Illinois, U.S.A). Bei Fishers exaktem Test und dem χ^2 -Test von Pearson wurde als maximale Irrtumswahrscheinlichkeit für das Signifikanzniveau ein p-Wert von 0,05 angenommen. Die Festlegung des Grades der Übereinstimmung beim Kappa-Vergleich erfolgte analog Tabelle 7.

Tabelle 7: Bewertung des Vergleichs nach Cohens Kappa

$\kappa \leq 0,1$	keine Übereinstimmung
$0,1 < \kappa \leq 0,4$	schwache Übereinstimmung
$0,4 < \kappa \leq 0,6$	deutliche Übereinstimmung
$0,6 < \kappa \leq 0,8$	starke Übereinstimmung
$0,8 < \kappa \leq 1,0$	fast vollständige Übereinstimmung

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des Untersuchungskollektivs

Insgesamt konnten aus dem Archiv des Instituts für Pathologie von 251 Patienten mit einem Magenkarzinom des intestinalen Typs nur 35 Patienten identifiziert werden, bei denen sowohl Biopsate vor der Operation als auch die korrespondierenden resezierten Tumore vorlagen. Es handelte sich ausschließlich um formalinfixierte und paraffin-eingebettete Gewebeproben.

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 68,6 Jahre mit einem Umfang von 29 bis 90 Jahre. Die Geschlechtsverteilung betrug 19 (54,3%) männliche zu 16 (45,7%) weibliche Patienten. 5 (14,3%) Karzinome lagen im Bereich der Kardia, eines (2,8%) im Fundus, 8 (22,8%) im Korpus, 9 (35,7%) im Antrum, 2 (5,7%) in der kleinen Kurvatur, 2 (5,7%) in mehreren Teilbereichen des Magens. In 6 Fällen (17,1%) gab es keine näheren Angaben zur Lokalisation.

Entsprechend der TNM-Einteilung der UICC, 6. Auflage, wiesen 15 Fälle (42,9%) eine T1-, 7 Fälle (20%) eine T2-, 10 Fälle (28,6%) eine T3- und 3 Fälle (8,6%) eine T4-Kategorie auf. Bei 18 Patienten (51,4%) lagen keine Lymphknotenmetastasen vor, bei 17 (48,6%) waren regionäre Lymphknotenmetastasen nachweisbar. 6 Fälle (17,1%) entsprachen der N1-Kategorie, 8 (22,8%) der N2- und 3 (8,6%) der N3-Kategorie. 2 Fälle (G1, 5,7%) wiesen ein gut differenziertes Magenkarzinom auf, 19 (G2, 54,3%) ein mäßig differenziertes und 14 (G3, 40%) ein schlecht differenziertes. Im Durchschnitt lagen 12 Tage zwischen Biopsatentnahme und Magenresektion. Der größte Abstand zwischen Vorbefundung und Resektion betrug 71 Tage und in zwei Fällen erfolgte beides am selben Tag.

Die Patientencharakteristika sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Charakteristik des Untersuchungskollektivs

Patienten	Tage zwischen Biopsie und OP	Alter	Geschlecht	Grading nach UICC	TNM nach UICC	Lokalisation
1	8	65	m	2	T1 N0 Mx	Korpus
2	5	71	m	3	T2 N0 Mx	Korpus
3	1	62	m	3	T2 N0 Mx	Antrum
4	1	83	w	2	T2 N1 Mx	Fundus
5	-	74	m	2	T2 N1 M1	Antrum
6	71	65	m	3	T2 N0 Mx	Kardia
7	31	62	m	2	T3 N0 Mx	Kardia
8	7	60	w	3	T3 N2 Mx	Kardia
9	8	53	m	1	T1 N0 Mx	Korpus
10	13	84	m	3	T3 N1 Mx	kleine Kurvatur
11	7	74	m	2	T2 N3 Mx	Korpus
12	9	83	m	2	T3 N3 Mx	Magen o.n.A.
13	5	49	w	2	T3 N1 Mx	Kardia
14	21	69	w	2	T2 N0 Mx	Antrum
15	7	77	m	3	T2 N2 Mx	Magen o.n.A.
16	8	54	w	2	T3 N0 Mx	Korpus
17	10	45	m	3	T2 N0 Mx	Korpus
18	14	59	w	3	T2 N0 Mx	Antrum
19	5	65	m	3	T2 N0 Mx	Magen o.n.A.
20	9	73	m	2	T2 N3 Mx	Magen o.n.A.
21	-	60	w	3	T1 N0 Mx	mehrere Teilbereiche
22	9	90	w	3	T2 N0 Mx	Korpus
23	36	85	w	3	T4 N2 Mx	Korpus
24	17	67	m	3	T3 N2 M1	kleine Kurvatur
25	13	81	m	2	T2 N1 Mx	kleine Kurvatur
26	1	29	w	1	T1 N0 Mx	Antrum
27	21	75	w	2	T3 N2 Mx	Magen o.n.A.
28	28	81	w	2	T1 N0 Mx	Magen o.n.A.
29	18	85	w	2	T1 N0 Mx	Antrum
30	13	46	m	2	T1 N0 Mx	mehrere Teilbereiche
31	8	59	w	2	T3 N2 Mx	Antrum
32	1	76	m	3	T3 N1 M1	Kardia
33	3	85	w	2	T3 N2 Mx	Antrum
34	16	74	m	2	T3 N2 Mx	Antrum
35	7	83	w	2	T3 N0 Mx	Magen o.n.A.

3.2 Immunhistochemie

3.2.1 Expression von AT1R

3.2.1.1 Verteilung der Immunreaktivität von AT1R

Der Nachweis von AT1R gelang sowohl an Biopsaten als auch an Resektaten. AT1R fand sich sowohl membranständig als auch zytoplasmatisch und war oft ungleichmäßig im Tumorgewebe verteilt.

Die Abbildungen 1 und 2 verdeutlichen die Charakteristika der Expression von AT1R im Tumorgewebe.

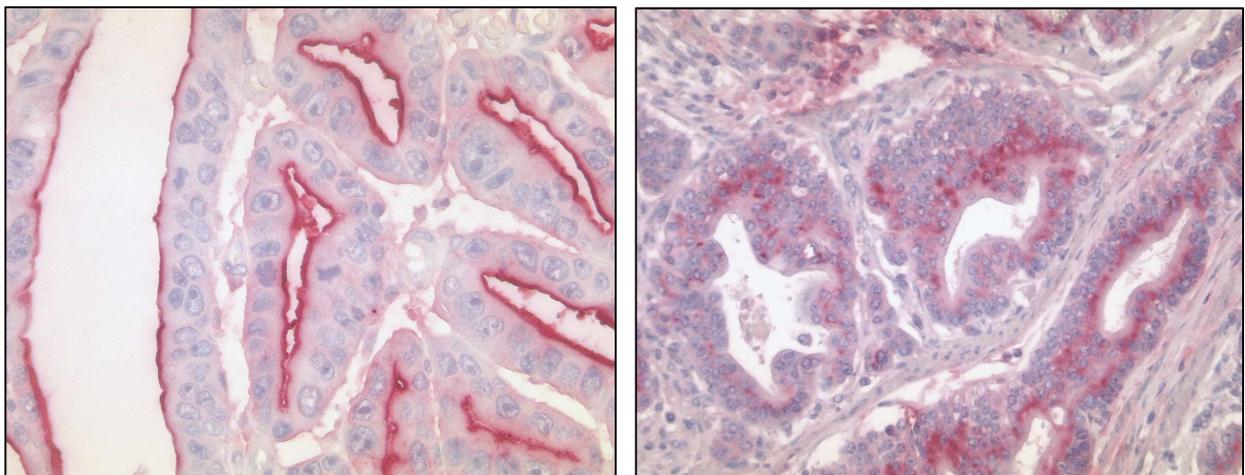


Abbildung 6: Expressionsmuster von AT1R im Magenkarzinomgewebe von Resektaten mit membranständiger (links) und zytoplasmatischer Expression (rechts).

Anti-AT1R-Antikörper, Hämalun-Gegenfärbung, Originalvergrößerungen x 400 (links), x 200 (rechts).

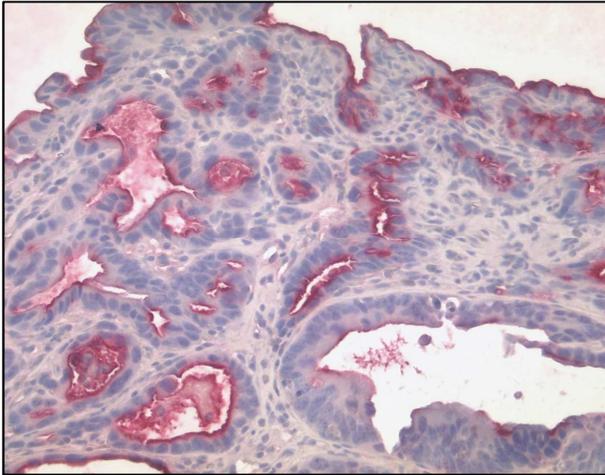


Abbildung 7: Expression von AT1R im Magenkarzinom eines Biopsates mit membranständiger Expression.

Anti-AT1R-Antikörper, Hämalaun-Gegenfärbung, Originalvergrößerungen x 200.

3.2.1.2 Grad der Expression vom AT1R

AT1R-immunreaktive Tumorzellen konnten in 25 Resektaten (71,4%) und 19 Biopsaten (54,3%) nachgewiesen werden. Von den 25 Tumorresektaten wiesen 16 (45,7%) Fälle eine membranständige Expression des AT1R auf, mit einem mittleren IRS von 3,2. Bei ebenfalls 16 Patienten wurde AT1R zytoplasmatisch mit einem mittleren IRS von 3,6 nachgewiesen. Bei der Auswertung der Biopsate konnten 15 (42,9%) Fälle mit einer membranständigen Färbung und einem mittleren IRS von 3,9 ermittelt werden. 11 Biopsate (31,4%) zeigten eine zytoplasmatische Expression mit einem mittleren IRS von 3,1.

3.2.1.3 Statistik

Die Auswertung der Cut-off-0-Werte ergab Folgendes: Der Vergleich der Expression von AT1R in Resektat und Biopsat erbrachte eine signifikante Korrelation ($p < 0,02$) und eine deutliche Übereinstimmung ($\kappa: 0,407$). Eine statistisch signifikante Beziehung zwischen der Expression von AT1R und den klinisch pathologischen Parametern (N+, N0, N1, N2, N3) konnte nicht ermittelt werden.

Unterscheidet man die Expression in membranständig und zytoplasmatisch, ergaben sich folgende Ergebnisse: Der Vergleich der membranständigen Färbereaktion bei Resektat und Biopsat ergab eine signifikante Korrelation ($p < 0,007$) und eine deutliche Übereinstimmung mit $\kappa=0,479$. Bei der zytoplasmatischen Färbung konnte ein Signifikanzniveau im Grenzbereich von $p < 0,065$ und eine schwache Übereinstimmung

(κ : 0,351) gefunden werden. Es ergab sich kein Zusammenhang zwischen N-Kategorie und einer membranständigen oder zytoplasmatischen Expression.

Die Betrachtung der Cut-off- Werte von 2 und 3 führte zu folgenden Änderungen bei den signifikanten Korrelationen. Bei den Cut-off-3-Werten korrelierte die negative AT1-Gruppe in Resektat und Biopsat ($p < 0,005$ und $p < 0,022$) signifikant mit der N+ Gruppe. Ebenfalls korrelierte die positive AT1R-Expression signifikant ($p < 0,003$) mit der N0-Gruppe der einzelnen N-Kategorien. Die Betrachtung der zytoplasmatischen und membranständigen Expression der Cut-off-3-Werte ergab ein signifikantes Verhältnis ($p < 0,022$) bei der negativen zytoplasmatischen AT1R-Gruppe im Exzusat mit der N+ Gruppe und eine Signifikanzbeziehung im Grenzbereich von $p < 0,051$ bei der negativen membranständigen AT1R-Gruppe bei den Biopsaten und der N+ Gruppe. Beim Vergleich der zytoplasmatischen Expression mit den einzelnen N-Kategorien wurde ebenfalls ein signifikante Beziehung im Grenzbereich ($p < 0,058$) zwischen der negativen Expression in den Resektaten und der N2-Gruppe ermittelt.

3.2.2 Expression von AT2R

3.2.2.1 Verteilung der Immunreaktivität von AT2R

AT2R konnte ebenfalls in den entnommen Tumorproben und im Tumorsektat nachgewiesen werden. Die Abbildungen 3 und 4 zeigen die membranständige und zytoplasmatische Expression von AT2R im Tumorgewebe, welche sich ebenfalls sehr ungleichmäßig verteilt darstellte.

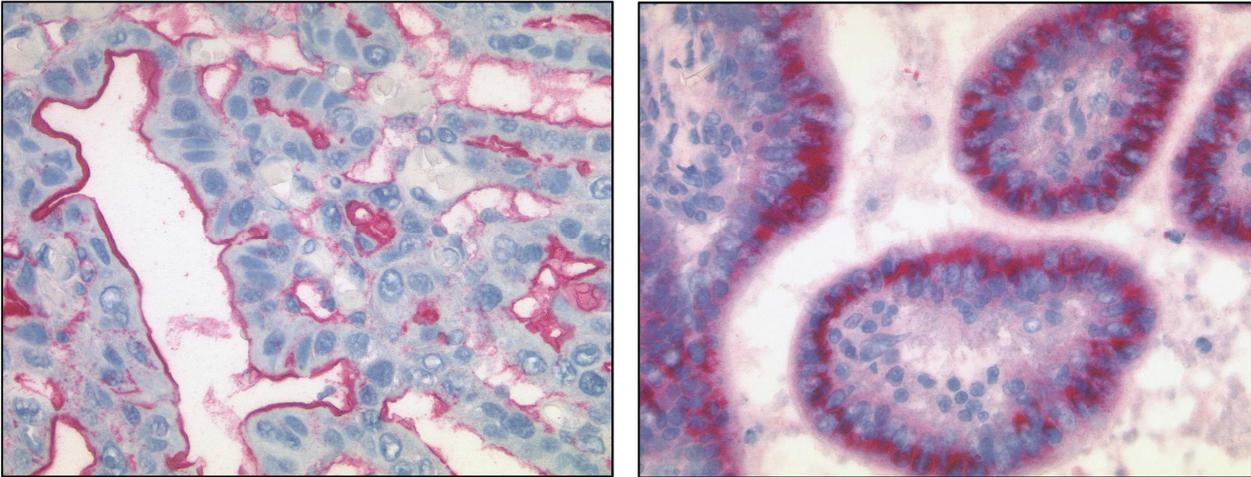


Abbildung 8: Expressionsmuster von AT2R im Magenkarzinom der Resektate mit membranständiger (links) und zytoplasmatischer Expression (rechts)

Anti-AT2R-Antikörper, Hämalan-Gegenfärbung, Originalvergrößerungen x 400 (links), x 200 (rechts).

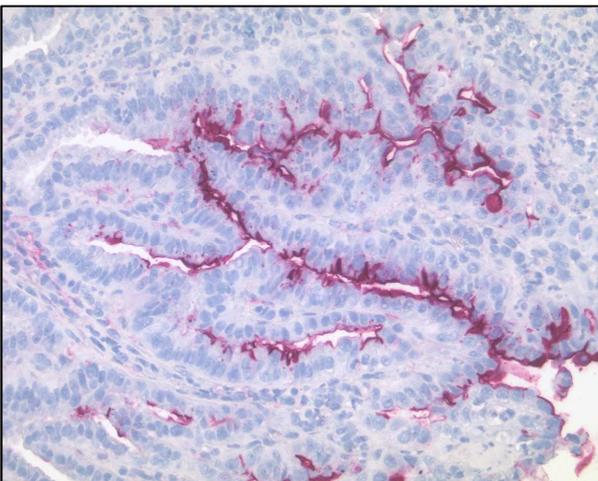


Abbildung 9: Expression von AT2R im Magenkarzinom eines Biopsates mit membranständiger Expression.

Anti-AT2R-Antikörper, Hämalan-Gegenfärbung, Originalvergrößerungen x 200.

3.2.2.2 Grad der Expression vom AT2R

Insgesamt wurden in 25 Resektaten (71,4%) AT2R-immunreaktive Tumorzellen nachgewiesen. Bei den Biopsaten waren es 23 (65,8%) Fälle. Bei den Resektaten konnte jeweils bei 15 (42,9%) unabhängigen Fällen eine membranständige oder zytoplasmatische Expression beobachtet werden. Die Bewertung der Expression ergab für die membranständige Färbung einen IRS-Mittelwert von 3,7 und bei der zytoplasmatischen Färbung einen mittleren IRS von 4,1. Bei 16 Biopsaten (45,7%) konnte eine membranständige Expression mit einem mittleren IRS von 3,7 ermittelt werden. 15 Biopsate (42,9%) zeigten eine zytoplasmatische Färbereaktion mit einem mittleren IRS von 3,3.

3.2.2.3 Statistik

Die Statistische Auswertung der Cut-off-0-Werte brachte folgende Ergebnisse. Ein statistischer Zusammenhang zwischen der AT2R-Expression im Resektat und Biopsat bewegt sich im Grenzbereich von $p < 0,059$. Der Vergleich mit Cohens Kappa ergab eine schwache Übereinstimmung ($\kappa: 0,34$). Es ergab sich eine signifikante Beziehung ($p < 0,034$) zwischen positiver AT2R-Expression in den Biopsaten und der Gruppe ohne befallene Lymphknoten (N-). Ebenfalls gab es eine signifikante Korrelation ($p < 0,029$) zwischen dem positiven AT2R-Nachweis in den Biopsaten und der N0-Gruppe der N-Kategorien, welche die oben beschriebene Beobachtung stützt. Alle anderen Untersuchungen zeigten keine statistische Beziehung zwischen AT2R-Expression und den N-Kategorien.

Bei der Betrachtung der membranständigen und der zytoplasmatischen Färbeergebnisse zeigten sich folgende Resultate. Die membranständige AT2R-Expression in den Biopsaten korrelierte signifikant ($p < 0,044$) mit den Resektaten und war durch eine schwachen Übereinstimmung ($\kappa: 0,364$) gekennzeichnet. Ähnliche Ergebnisse gab es für die zytoplasmatischen Immunreaktionen: Biopsate und Resektate korrelieren signifikant ($p < 0,027$) und haben nach Kappa eine schwache Übereinstimmung ($\kappa: 0,397$). Eine Beziehung zwischen den Lymphknotenbefunden und den membranständigen bzw. zytoplasmatischen Färbeergebnissen konnte nicht gefunden werden.

Die Berücksichtigung der Cut-off-Werte von 2 und 3 ergab folgende Änderungen im Signifikanzverhalten. So erbrachte der Vergleich der Expression zwischen Resektat und Biopsat bei den Cut-off-3-Werten eine signifikante Korrelation ($p < 0,01$) und eine deutliche Übereinstimmung nach Kappa ($\kappa: 0,581$). Ebenfalls ergab sich eine signifikante Korrelation im Grenzbereich ($p < 0,057$) für die Cut-off 3-Werte der negativen AT2R-Expression im Resektat mit der N2-Gruppe. Ein signifikante Beziehung ($p < 0,011$) trat nun ebenfalls zwischen der positiven membranständigen Expression der Biopsate (Cut-off 3) und der negativen N-Gruppe auf. In Bezug auf die einzelnen N-Kategorien ergab sich eine signifikante Korrelation ($p < 0,03$) zwischen der negativen membranständigen AT2R-Expression (Cut-off 3) bei den Biopsien und der N2-Gruppe.

3.2.3 Expression des Mas-Rezeptors

3.2.3.1 Verteilung der Immunreaktivität des Mas-Rezeptors

Der immunhistochemische Nachweis des Mas-Rezeptors erfolgte ebenfalls in Resektat und Biopsat. Die Abbildungen 5 und 6 geben die membranständige und die zytoplasmatische Expression von Mas-Rezeptor in den Tumorzellen wieder. Auffällig ist die deutlich schlechtere Darstellung der Immunreaktion im Vergleich zu den Färbungen von AT1R und AT2R.

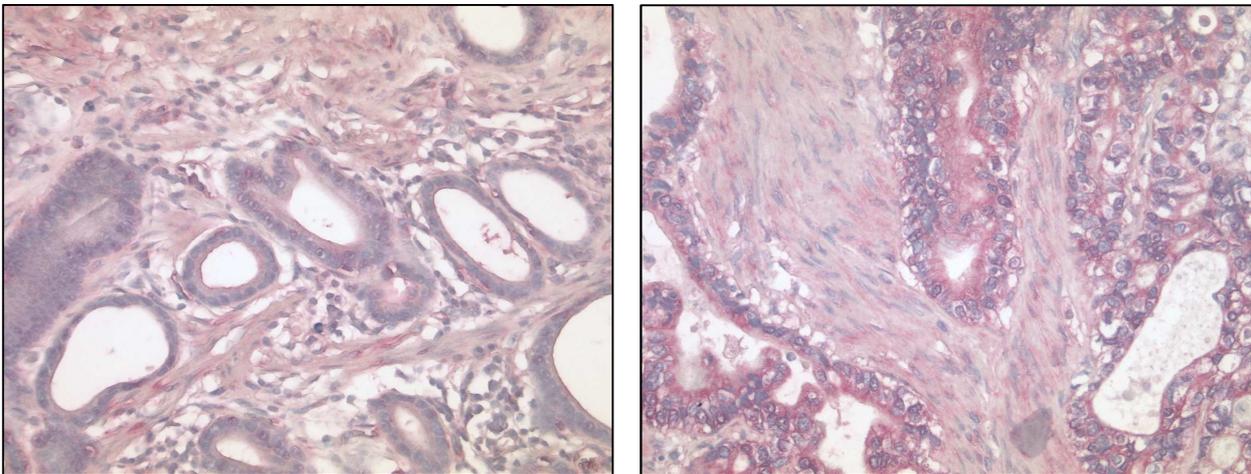


Abbildung 10: Expressionsmuster des Mas-Rezeptor im Magenkarzinomresektat mit membranständiger (links) und zytoplasmatischer Expression (rechts)

Anti-Mas-Rezeptor-Antikörper, Hämalan-Gegenfärbung, Originalvergrößerungen x 200.

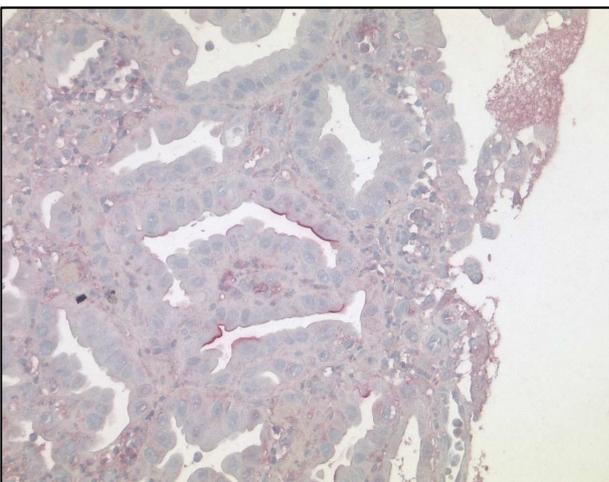


Abbildung 11: Expressionsmuster des Mas-Rezeptors im Magenkarzinombiopsat mit membranständiger Expression.

Anti-Mas-Rezeptor-Antikörper, Hämalan-Gegenfärbung, Originalvergrößerungen x 200.

3.2.3.2 Grad der Expression des Mas-Rezeptors

Insgesamt zeigten 27 Resektate (77,1%) eine positive Immunreaktion für den Mas-Rezeptor. Bei den Biopsaten waren 26 (74,3%) Fälle positiv. 5 Resektate (14,3%) zeigten eine membranständige Immunreaktion. Der IRS betrug im arithmetischen Mittel 2,8. Bei 25 Resektaten (71,4%) konnte eine positive zytoplasmatische Expression mit einem mittleren IRS von 3,9 beobachtet werden. Die Auswertung der Biopsate ergab 14 (40%) positive membranständige Patientenfälle mit einem durchschnittlichen IRS von 3,3 und 19 (54,3%) positive zytoplasmatische Nachweise mit einer mittleren IRS von 3,5.

3.2.3.3 Statistik

Der statistische Vergleich der Cut-Off-Werte der Expression vom Mas-Rezeptor in Resektat und Biopsat zeigte keine Übereinstimmung. Die Expression vom Mas-Rezeptor im Tumorgewebe ergab ebenfalls keine Korrelation zu befallenen regionären Lymphknoten und den einzelnen N-Kategorien. Eine Unterscheidung in eine membranständige oder zytoplasmatische Färbereaktion erbrachte zwischen Resektat und Biopsat und jeweiligen Lymphknotenbefunden keine signifikanten Häufigkeiten. Die Berücksichtigung der IRS-Werte von Cut-Off 2 und 3 brachte keine Änderungen im Signifikanzverhalten. Einzige Ausnahme bildete eine signifikante Beziehung ($p < 0,011$) zwischen einer negativen membranständigen Mas-Rezeptor-Expression bei den Biopsaten und der N2-Gruppe.

3.2.4 Vergleich von AT1R, AT2R und Mas-Rezeptor

3.2.4.1 Statistik

Der Vergleich der Expression der einzelnen Rezeptoren im Patientenkollektiv ergab folgende Ergebnisse. Die Expression von AT1R und AT2R korrelierte signifikant miteinander im Resektat ($p < 0,004$) und im Biopsat ($p < 0,003$). Keine Korrelation fand sich zwischen der Expression von AT1R und Mas-Rezeptor, bzw. AT2R und Mas-Rezeptor.

3.2.5 Kontrollen

Bei jedem Färbedurchlauf wurden mehrere Negativkontrollen mitgeführt, indem die Primärantikörper weggelassen wurden. Eine Gegenfärbung erfolgte wie bei den anderen Gewebeproben mit Hämalaunlösung. Es wurde in keiner Negativkontrolle eine Immunreaktion beobachtet.

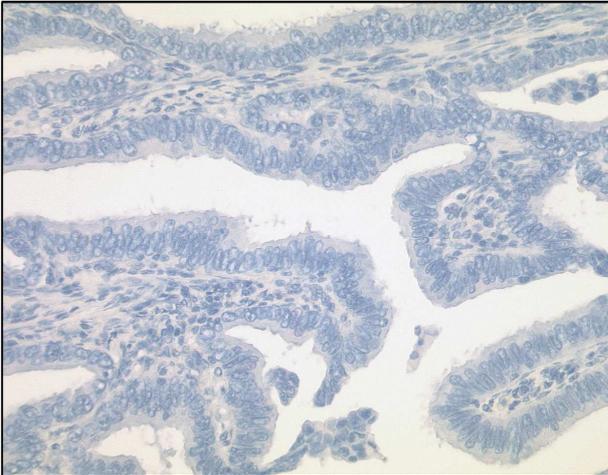


Abbildung 12: Negativkontrolle

Hämalaun-Gegenfärbung, Originalvergrößerungen x 200.

3.2.6 Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse

Folgende Tabellen geben die Resultate der statistischen Auswertung wieder.

Tabelle 9: Korrelation der AT1R-, AT2R- und Mas-Rezeptor-Expression in Resektat und Biopsat

	Test	AT1R	AT2R	Mas-Rezeptor
Korrelation Resektat Biopsat (Cut-off 0)	p-Wert, Exakter Test nach Fisher	0,02	0,059	1
	Kappa	0,407	0,34	-0,009
Korrelation Resektat Biopsat (Cut-off 2)	p-Wert, Exakter Test nach Fisher	0,092	0,075	0,7
	Kappa	0,316	0,37	-0,101
Korrelation Resektat Biopsat (Cut-off 3)	p-Wert, Exakter Test nach Fisher	0,001	0,01	0,164
	Kappa	0,595	0,581	0,25

Tabelle 10: Korrelation der membranständigen und zytoplasmatischen AT1R-, AT2R- und Mas-Rezeptor-Expression in Resektat und Biopsat

	Test	AT1R mem	AT1R zyto	AT2R mem	AT2R zyto	Mas-Rezeptor mem	Mas-Rezeptor zyto
Korrelation Resektat Biopsat (Cut-off 0)	p-Wert, Exakter Test nach Fisher	0,007	0,065	0,044	0,027	0,134	1
	Kappa	0,479	0,351	0,364	0,397	0,269	0,051
Korrelation Resektat Biopsat (Cut-off 3)	p-Wert, Exakter Test nach Fisher	0,06	0,044	0,00	0,03	1	0,424
	Kappa	0,533	0,235	0,676	0,410	0,05	0,161

Tabelle 11: Korrelation AT1R-, AT2R- und Mas-Rezeptor-Expression mit Nodalstatus (N+ vs. N-)

	Test	AT1R Resektat	AT1R Biopsat	AT2R Resektat	AT2R Biopsat	Mas – Rezeptor Resektat	Mas – Rezeptor Biopsat
Korrelation mit N+, N- (Cut-off 0)	p-Wert, Exakter Test nach Fisher	0,458	0,306	1	0,034 AT2+ und N0	0,7	0,7
Korrelation mit N+, N- (Cut-off 2)	p-Wert, Exakter Test nach Fisher	0,087	0,097	0,721	0,041 AT2+ und N0	1	0,312
Korrelation mit N+, N- (Cut-off 3)	p-Wert, Exakter Test nach Fisher	0,005 AT1- und N+	0,022 AT1- und N+	0,321	0,011 AT2+ und N-	1	0,721

Tabelle 12: Korrelation der membranständigen und zytoplasmatischen AT1R- und AT2R-Expression mit Nodalstatus (N+ vs. N-)

	Test	AT1R mem Resektat	AT1R zyto Resektat	AT1R mem Biopsat	AT1R zyto Biopsat	AT2R mem Resektat	AT2R zyto Resektat	AT2R mem Biopsat	AT2R zyto Biopsat
Korrelation mit N+, N- (Cut-off 0)	p-Wert, Exakter Test nach Fisher	0,506	0,182	0,097	0,144	0,321	1	0,182	0,144
Korrelation mit N+, N- (Cut-off 3)	p-Wert, Exakter Test nach Fisher	0,141	0,022 AT1- und N+	0,051 AT1- und N+	0,07 AT1- und N+	0,346	0,7	0,011 AT2+ und N0	0,1

Tabelle 13: Korrelation der membranständigen und zytoplasmatischen Mas-Rezeptor-Expression mit Nodalstatus (N+ vs. N-)

	Test	Mas-Rezeptor mem Resektat	Mas-Rezeptor zyto Resektat	Mas-Rezeptor mem Biopsat	Mas-Rezeptor zyto Biopsat
Korrelation mit N+, N- (Cut-off 0)	p-Wert, Exakter Test nach Fisher	0,631	0,721	0,512	0,734
Korrelation mit N+, N- (Cut-off 3)	p-Wert, Exakter Test nach Fisher	0,429	0,735	1	0,246

Tabelle 14: Korrelation AT1R-, AT2R- und Mas-Rezeptor-Expression mit N-Kategorie

	Test	AT1R Resektat	AT1R Biopsat	AT2R Resektat	AT2R Biopsat	Mas- Rezeptor Resektat	Mas- Rezeptor Biopsat
Korrelation Expression mit N- Kategorie (Cut-off 0)	p-Wert, Chi- Quadrat nach Pear- son	0,318	0,173	0,243	0,029 AT2+ und N0	0,661	0,66
Korrelation Expression mit N- Kategorie (Cut-off 2)	p-Wert, Chi- Quadrat nach Pear- son	0,068 AT1+ und N0	0,115	0,099	0,079 AT2+ und N0	0,504	0,675
Korrelation Expression mit N- Kategorie (Cut-off 3)	p-Wert, Chi- Quadrat nach Pear- son	0,003 AT1+ und N0	0,1	0,057 AT2- und N2	0,034 AT2- und N2	0,822	0,216

Tabelle 15: Korrelation der membranständigen und zytoplasmatischen AT1R- und AT2R-Expression mit N-Kategorie

	Test	AT1R mem Resektat	AT1R zyto Resektat	AT1R mem Biopsat	AT1R zyto Biopsat	AT2R mem Resektat	AT2R zyto Resektat	AT2R mem Biopsat	AT2R zyto Biopsat
Korrelation mit N- Kategorie (Cut-off 0)	p-Wert, Chi- Quadrat nach Pearson	0,393	0,482	0,193	0,266	0,060 AT2-und N2	0,855	0,271	0,305
Korrelation mit N- Kategorie (Cut-off 3)	p-Wert, Chi- Quadrat nach Pearson	0,133	0,058 AT1- und N2	0,202	0,224	0,239	0,316	0,03 AT2- und N2	0,915

Tabelle 16: Korrelation der membranständigen und zytoplasmatischen Mas-Rezeptor-Expression mit N-Kategorie

	Test	Mas mem Re- sektat	Mas zyto Re- sektat	Mas mem Biop- sat	Mas zyto Biop- sat
Korrelation mit N- Kategorie (Cut-off 0)	p-Wert, Chi-Quadrat nach Pearson	0,399	0,823	0,580	0,746
Korrelation mit N- Kategorie (Cut-off 3)	p-Wert, Chi-Quadrat nach Pearson	0,712	0,746	0,038 Mas- und N2	0,409

4. Diskussion

4.1 Untersuchungskollektiv

Für diese Untersuchung erfolgte eine Auswahl von 251 Patienten mit einem Magenkarzinom vom intestinalen Typ, welche im Zeitraum von 1995-2006 in der Charité operiert wurden. Leider lagen vom größten Teil der betroffenen Patienten keine Präparate von Voruntersuchungen vor, bedingt durch die Tatsache, dass in der Charité vor allem die operative Versorgung von Patienten erfolgt und Erstdiagnose und Vorbehandlung vermutlich meist in anderen Einrichtungen (z.B. niedergelassener Arzt oder externes Krankenhaus) erbracht wurden. Erschwerend bei der Auswahl eines geeigneten Untersuchungskollektives erwies sich die Beeinträchtigung des Archivs des Instituts für Pathologie der Charité durch einen Wasserschaden. Hierbei war ein Großteil des Archivmaterials aus den Jahren 2000-2002 zerstört worden und stand somit nicht mehr zur Verfügung. Insgesamt konnten 35 Patientenfälle mit geeigneten Präparaten ausgewählt werden. In Betracht der geringen Fallzahl ist es fraglich, ob diese Untersuchung als repräsentativ gewertet werden kann, Röcken et al. (2005) untersuchte 58 Patientenfälle in einer vergleichbaren Studie. Das Durchschnittsalter des Kollektivs mit 68,6 Jahren entspricht der Beobachtung des World Cancer Reports 2003 (Stewart und Kleihues, 2003), wobei der Inzidenz Gipfel des Magenkarzinoms im hohen Alter erreicht wird. Der Charakterisierung von Crew et al. (2006), dass der intestinale Typ eher bei Frauen auftritt, konnte mit einer Geschlechtsverteilung im Untersuchungskollektiv von männlich zu weiblich mit 1,2:1 nicht entsprochen werden.

4.2 Relevanz der immunhistochemischen Färbung

Mit Hilfe immunhistochemischer Arbeitstechniken will man spezifische antigene Strukturen in Zellen oder Zelloberflächen nachweisen und darstellen. Hierbei wird ein spezifischer Antikörper mit Farbstoffen oder Markerenzymen konjugiert. Um die Sensitivität zu steigern, ist es üblich einen Zwischenschritt mit einem Sekundärantikörper einzufügen, welcher nun das gewünschte Chromogen oder Markerenzym trägt. Die meisten heute verwendeten immunhistochemischen Färbemethoden basieren auf der hohen Affinität

von Streptavidin bzw. Avidin zu Biotin. Unterschiede der im Handel gebräuchlichen Systeme beziehen sich meist auf das verwendete Chromogen. Üblich ist ein Enzymmarker aus Meerrettichperoxidase oder alkalischer Phosphatase (AP). Die hier verwendete LSAB-Methode (Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode) wird in der Literatur als ein einfach zu handhabendes und sehr sensitives System beschrieben (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000). Anfällig ist diese Methode durch die vielen Zwischenschritte, man sollte sich deswegen um möglichst standardisierte Bedingungen bemühen. Weitere Fehlerquellen, welche das Färbeergebnis mindern, entstehen durch zu dicke Gewebeschnitte, zu hohe Primärantikörperkonzentrationen oder unzureichende Blockierung des endogenen Avidins, Biotins und gegebenenfalls auftretender endogener alkalischer Phosphatase. Durch eine hitzeinduzierte Antigendemaskierung können Antikörper auch Epitope erreichen, welche durch die Fixierung mit Aldehyden verdeckt wurden (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000). Bei der Färbung von AT1R konnte so eine deutlich verbesserte Darstellung der Antigene erreicht werden, bei AT2R und dem Mas-Rezeptor zeigte sich keine Steigerung der Färbequalität. Um eventuell auftretende unspezifische Reaktionen des Primärantikörpers auszuschließen, liefen in jedem Durchgang mehrere Negativkontrollen mit. Unterschiede in der Intensität der Färbereaktion können ebenfalls durch ungünstige Fixation und eine längere Lagerungszeit des Archivmaterials bedingt sein.

Ergebnisse immunhistochemischer Untersuchungen aus unterschiedlichen Studien lassen sich nur schwer vergleichen, was zum einen durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper, zum anderen durch die Vielzahl der erhältlichen Färbekits und verschiedener Färbeprotokolle bedingt wird. So gibt es Unterschiede in der Sensitivität und Spezifität mono- oder polyklonaler Antikörper. Polyklonale Antikörper, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, sind anfällig gegenüber Kreuzreaktionen mit anderen, ähnlichen Antigenstrukturen, reagieren aber weniger sensibel auf Veränderungen an den Epitopen durch die Fixierung, da sie mehrere antigene Determinanten erkennen. Kritisch kann auch die Herkunft der verwendeten Antikörper sein. In dieser Arbeit wurden Antikörper benutzt, die in Partnerlaboren hergestellt und aufgereinigt wurden. Der Großteil der publizierten Studien verwendet aber kommerzielle Antikörper, deren Spezifität unter Umständen unsicher ist. Die hier angefertigten immunhistochemischen Färbungen von AT1R und AT2R zeugen von einer hohen Spezifität, die Antikörper wurden aber bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe verwendet.

Röcken et al. benutzte in der vorangegangenen Studie zu AT1R und AT2R im Magenkarzinom (Röcken et al., 2007) einen kommerziellen Antikörper von BioTrend und den Vectastain® ABC-AP Kit und Fast Red/Naphthol Mx (Immunotech) als Chromogen. Hierbei wurden nur zytoplasmatische Färbereaktionen von AT1R und AT2R in Tumorzellen beobachtet. 20% zeigten einen positiven Nachweis für AT1R beim intestinalen Typ, dies ist deutlich niedriger als die 45,7% für die positive zytoplasmatische Färbung von AT1R bei den Resektaten in dieser Untersuchung. Röcken wies in 95% seiner untersuchten Magenkarzinomfälle eine positive zytoplasmatische Reaktion für AT2R nach, er unterscheidet hier nicht nach den histologischen Subtypen. In dieser Studie wurden nur bei 42,9% eine positive zytoplasmatische Färbung für AT2R bei den Resektaten nachgewiesen. Diese Unterschiede legen die Vermutung nahe, dass die hier verwendeten Antikörper andere Epitope nachweisen, als die kommerziell erhältlichen Antikörper.

4.3 Auswertung

Nach der Darstellung der entsprechenden Rezeptoren wurden die Intensität und die Verteilung der immunhistochemischen Färbung beurteilt. Durch Addition von Intensität und Verteilung konnte der IRS berechnet werden. Dies ermöglichte eine differenzierte Bewertung der oft sehr inhomogenen Expression der jeweiligen Rezeptoren. Es wurde bewusst ein Summenscore benutzt, da es sich hier um kategoriale Werte handelt und eine Multiplikation eine große Zahlenverteilung dieser subjektiven Daten hervorbringt, welche fälschlicherweise eine große Streuung impliziert. Da diese Methode subjektiv ist und von der Erfahrung des Betrachters abhängt, erfolgte die Evaluation der Immunreaktionen an jeder Probe mindestens drei Mal und wurde anschließend noch einmal im Konsens mit einem erfahrenen Facharzt für Pathologie abgestimmt. Aufgrund der endgültig begrenzten und stark divergenten Datenmenge bot sich eine allgemeine statistische Auswertung der gesammelten Daten aus dem Summenscore nicht an. Somit wurde anfangs eine Korrelationsanalyse mit der einfachen Unterscheidung zwischen gefärbten (positiv/+) und ungefärbten (negativ/-) Tumorzellen durchgeführt. Die Auswertung dieser kategorialen Werte erfolgte mit dem Cohens Kappa-Vergleich und Fishers exaktem Test. Die Korrelation der Rezeptorexpression mit den N-Kategorien wur-

de mit dem Chi²-Test von Pearson überprüft, da die betrachteten Merkmale nicht nur zwei, sondern mehrere Ausprägungen (N0, N1, N2, N3) aufwiesen. Die Expression der Angiotensin II-Rezeptoren war zum Teil in der Intensität sehr schwach oder sehr inhomogen verteilt. Um mögliche Fehlinterpretationen des Betrachters in ihrer Wirkung auf das Gesamtergebnis zu minimieren, erfolgten alle statistischen Auswertungen noch einmal. Hierbei wurden die ermittelten Daten des IRS mit einem Ergebnis von 2 als negativ gewertet (Cut-off 2). In einem nächsten Schritt wurden alle Werte mit einem Resultat von 2 und 3 (Cut-off 3) als negativ gewertet.

4.4 Ergebnisse

Im Kapitel 1.6 wurde auf die evidente Beziehung zwischen dem lokalen Angiotensin II-System und der Tumorbiologie hingewiesen. Besonders experimentelle Studien zeigten den Einfluss von Angiotensin II-Rezeptoren auf die Tumorentwicklung durch die Steuerung von Neoangiogenese, der Tumorzellproliferation und der lokalen Entzündungsreaktion (Deshayes und Nahmias, 2005). Zur Bedeutung des lokalen Angiotensin II-Systems für die malignen Tumore des Gastrointestinaltraktes gibt es bisher wenige Untersuchungen, diese erfolgten vor allem durch die Arbeitsgruppe um Professor Röcken, Uniklinikum Kiel. Röcken et al. zeigten, dass ACE lokal im Magenkarzinom exprimiert wird und dass der Insertions-/Deletions-Polymorphismus des ACE-Gens Tumorentwicklung und Metastasierung beeinflusst (Röcken et al., 2005). Die lokale Expression von AT1R und AT2R im menschlichen Magenkarzinom wurde ebenfalls durch Proteinanalyse und Immunhistochemie nachgewiesen. Die pathophysiologische Bedeutung der AT1R vermittelten Signale, besonders beim intestinalen Typ, weisen Röcken et al. durch die signifikante Korrelation zwischen AT1R-Expression und dem Vorhandensein und der Anzahl von Lymphknotenmetastasen nach. So korreliert die positive AT1R-Expression mit der Anzahl der Lymphknotenmetastasen, dem N-Status und den UICC-Tumorstadien (Röcken et al., 2007). Diese Beobachtungen konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, obwohl sich auch diese Untersuchung nur auf den intestinalen Typ des Magenkarzinoms konzentriert hat. Gerade die Ergebnisse der statistischen Auswertung der Cut-off-3-Werte erbringen eine gegenteilige Aussage: hier korrelierte eine verminderte Expression des AT1R signifikant mit dem Nodalstatus und die AT1R-

positiven Magenkarzinome mit der N0-Gruppe, damit wurde eine inverse Korrelation zwischen AT1R-Status und Nodalstatus nachgewiesen. Trotz dieser gegenteiligen Beobachtungen muss jedoch festgehalten werden, dass erneut ein Zusammenhang zwischen ATR1-Expression in Karzinomzellen und dem Nodalstatus festgestellt wurde. Da jeweils in diesen beiden Studien unterschiedliche Antikörper eingesetzt wurden, die entweder eine ausschließlich zytoplasmatische oder eine membranständige und zytoplasmatische Immunreaktion aufwiesen, stellt sich die Frage, ob ein potentieller tumorbiologischer Zusammenhang von der zellulären Lokalisation des Rezeptors abhängt. Der statistische Vergleich der membranständigen und zytoplasmatischen Immunreaktionen erbrachte in dieser Untersuchung keine signifikanten Unterschiede. Inwieweit der Nachweis von AT1R und AT2R im Biopsat Rückschlüsse auf klinisch-pathologische Patientencharakteristika, die am Resektat erhoben worden, zulässt und welche Aussagen damit verbunden sind, müssten weitergehende Untersuchungen mit größeren Fallzahlen klären.

Beim Vergleich der ermittelten AT1R-Nachweise zwischen dieser Untersuchung und der von Röcken et al. (2007) ist ebenfalls die deutlich geringere Fallzahl von 35 zu 59 Patienten zu beachten. Außerdem sind die generellen Nachteile der immunhistochemischen Auswertung, wie die stark begrenzte quantitative Aussage, die subjektive Bewertung und die schwierige Standardisierung der Arbeitsabläufe, zu berücksichtigen. Es wurde schon darauf hingewiesen, dass allein ein Wechsel des Antikörpers oder der Färbereagenzien, deutlich veränderte Ergebnisse zur Folge haben kann. Während bei der immunhistochemischen Untersuchung von Röcken et al. nur 20% der intestinalen Magenkarzinomfälle AT1R-positiv waren, sind es bei dieser Arbeit 71% bei den Exzissaten und 53% bei den Biopsaten. Zu beachten ist hierbei, dass in dieser Untersuchung sowohl zytoplasmatische und membranständige Immunreaktionen beobachtet wurden und nicht nur zytoplasmatische, wie in der vorhergehenden Studie. Vergleicht man die zytoplasmatischen Nachweise miteinander, ergibt sich eine positive AT1R-Reaktion bei den Resektaten von 45,7% und bei den Biopsien von 31,4% bei dieser Arbeit zu den 20% bei Röcken et al. (2007). Eine differenzierte Betrachtung der Expression von AT1R in Magenkarzinomzellen ist demzufolge notwendig, wenn AT1R als möglicher prädiktiver und prognostischer Marker etabliert werden soll. Beachtenswert ist die signifikante Korrelation zwischen AT2R-positiven Tumorzellen in den Biopsien und der Gruppe ohne

Lymphknotenmetastasen (N0-Gruppe). Hier könnte sich ein Hinweis auf die mögliche protektive Rolle von AT2R andeuten. Interessant wird dies, da in dieser Arbeit die AT2R-Expression deutlich differenzierter auftrat (71% bei den Resektaten, 66% bei den Biopsaten) als bei der 99%igen Expression bei den intestinalen Magenkarzinomfällen bei Röcken et al (2007). Um die von Röcken et al. erbrachten Ergebnisse zu bestätigen, und der Beobachtung in Bezug auf AT2R nachzugehen, sollten nachfolgende Untersuchungen mit deutlich größeren Fallzahlen erfolgen.

Hauptsächlich ging diese Untersuchung der Fragestellung nach, ob Angiotensin II-Rezeptoren geeignete Biomarker für die Prädiktion des biologischen Verhaltens eines Tumors sind und ob sich dahingehende prognostische Aussagen bereits bei der Auswertung von Biopsaten treffen lassen. Grundsätzlich sind folgende Probleme für die schlechte Prognose des Magenkarzinoms verantwortlich: Maligne Tumore des Magens werden zu spät diagnostiziert, da eine sichere Diagnose nur mit einer Gastroskopie gestellt werden kann, welche als Vorsorgeuntersuchung auf eine geringe Akzeptanz der Patienten stößt. Alle derzeitigen serumbasierten Biomarker haben eine zu geringe Sensitivität, um den Krebs im kurativen Stadium zu erkennen (Röcken et al., 2008). Die Angiotensin II-Rezeptoren sind hierbei sicherlich ungeeignet, da sie auch in gesundem Gewebe nachweisbar sind oder in Bezug auf AT2R, bei vielen pathologischen Vorgängen verstärkt exprimiert werden. Ein weiteres Problem stellt die Einschätzung der Prognose des Magenkarzinoms dar, so erfolgt die medikamentöse und chirurgische Therapie vor allem organbezogen. Eine frühzeitige Einschätzung von Hochrisikogruppen wäre für die Abstimmung der Therapie hilfreich.

Hier liegt eine große Chance für die Detektion von Teilen des LAS als prognostischer Biomarker. Berücksichtigt man die Studien von Röcken et al. (Röcken et al., 2005; Röcken et al. 2007), könnten neben der Bestimmung des ACE-Genpolymorphismus, mit dem Nachweis einer AT1R-Expression Hochrisikogruppen festgelegt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bereits eine immunhistologische Bestimmung von AT1R und AT2R im Stadium der Voruntersuchung sinnvoll ist. Die Expression von AT1R (Cut-off 0) korreliert signifikant in Biopsie und Exzusat. Bei der Einschätzung der AT2R-Expression der Cut-off-0-Werte wird der Grenzbereich des Signifikanzniveaus berührt, bei Cut-off 3 wird Signifikanz erreicht. Nach der Unterscheidung in membranständige und zytoplasmatische Expression, korrelieren auch hier Exzusat und Biopsie

signifikant. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass der größte Teil der nicht konkordanten Patientenfälle von Exzistat und Biopsie bei AT1R und AT2R falsch negativ war. Somit kann man davon ausgehen, dass bei einem positiven Nachweis in der Biopsie, auch im verbliebenen Tumorgewebe eine Expression nachweisbar wäre. Problematisch gestaltet sich die bereits beschriebene Inhomogenität der Expression der Angiotensin II-Rezeptoren im Tumorgewebe. So kann man nicht sicher sein, dass bei immunnegativen Tumorbiopsaten grundsätzlich keine Expression im übrigen Tumorgewebe vorliegt. Eine Einschätzung des biologischen Verhaltens eines Tumors sollte demnach auch andere Parameter, wie die Bestimmung des ACE-Genpolymorphismus berücksichtigen. Ein weiteres Aufgabenfeld ist die Etablierung weiterer prädiktiver und therapeutischer Biomarker, so gibt es allein 200 zugelassene Medikamente im Bereich der Krebstherapie und gerade einmal 6 Biomarker, die in der Pathologie zur Therapielenkung gastrointestinaler Tumore eingesetzt werden (Röcken et al. 2008). Sollten AT1R-Inhibitoren als Therapiemittel etabliert werden, kommt dem Nachweis von AT1R schon im Stadium der Voruntersuchung sowie zur weiteren Verlaufskontrolle eine große Bedeutung zu. Ebenfalls gilt zu beachten, dass die Komponenten des LAS, nachweislich bei einer Vielzahl von malignen Tumoren, aktiv an Infiltration und Metastasierung beteiligt sind. Somit liegt die Möglichkeit nahe, das LAS als prognostisches und therapeutisches Target zur Behandlung des Magenkarzinoms zu etablieren. Hierzu sind weiterführende experimentelle Studien notwendig.

Die Auswertung der Expression des Mas-Rezeptors in den Biopsien und den Exzistaten hat keine statistischen Zusammenhänge ergeben. Einzige Ausnahme bildet eine signifikante Korrelation ($p < 0,011$) zwischen einer negativen membranständigen Mas-Rezeptor-Expression (Cut-Off 3) bei den Biopsien und der N2-Gruppe. Diese Beobachtung kann man vernachlässigen, da es insgesamt nur einen positiven IRS bei Cut-off 3 gab. Bisher sind keine experimentellen Studien zur Biologie des Mas-Rezeptors im Magenkarzinom publiziert. Wichtig wäre, zuvorderst die Mas-Rezeptor-Expression in normalem und verändertem Magengewebe umfassend zu untersuchen. Eine alleinige immunhistochemische Studie ist hier sicherlich nicht ausreichend, es sollten auch Protein- und Genomanalysen stattfinden. Zumal die Immunreaktion für den Mas-Rezeptor in dieser Arbeit, im Vergleich zu AT1R und AT2R, deutlich weniger sensitiv ausfiel. Hier gilt es weiterhin geeignete Färbeprotokolle zu validieren.

Die Unterscheidung der Expression in membranständig und zytoplasmatisch erbrachte keine auffälligen statistischen Übereinstimmungen, welche den Beobachtungen der allgemeinen Antigenexpression widersprechen. Der Großteil der beschriebenen Korrelationen liegt bereits bei dem niedrigen Cut-off-Wert von 0 vor, nur bei den genannten Einzelfällen erfolgte eine Präzisierung der statistischen Verhältnisse durch höhere Cut-off-Werte.

4.5 Schlussfolgerung

Der wichtigste prognostische Faktor beim Magenkarzinom ist derzeit der Nodalstatus zum Zeitpunkt der Operation. Es gilt weitere Prognosefaktoren zu finden, die eine gezieltere Bestimmung des Operationsverfahrens und einer adjuvanten oder palliativen Chemotherapie zulassen.

Die Beteiligung des LAS an Tumorausbreitung und Metastasierung könnte die Angiotensin II-Rezeptoren zu prädiktiven und therapeutischen Zielstrukturen machen. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob bereits eine immunhistochemische Untersuchung an der Tumorbiopsie eine sichere Vorhersage über die Expression von Angiotensin II-Rezeptoren im Magenkarzinom trifft. Die Expression von AT1R korrelierte signifikant in Resektat und Biopsat. Bei AT2R bewegte sich dieser Vergleich im Grenzbereich des Signifikanzniveaus bei Cut-off 0 und korrelierte signifikant bei Cut-off 3. Der immunhistochemische Nachweis von AT1R und AT2R kann somit bereits am Biopsat und vor der onkologischen Resektion des Tumors verlässlich erfolgen. Inwieweit die Nachweise von AT1R und AT2R am Biopsat als prognostische und prädiktive Biomarker geeignet sind, müssen weitergehende Studien an größeren Fallserien klären.

Die Untersuchung der Expression des Mas-Rezeptors hat keine signifikanten Ergebnisse erbracht. Unser Wissen über die Rolle des Mas-Rezeptors in der Tumorbiologie ist noch sehr begrenzt. Aus diesem Grund sollten noch grundlegende Studien zum Expressionsverhalten des Mas-Rezeptors im Magenkarzinom erfolgen.

5. Zusammenfassung

Das lokale Angiotensin II-System greift in tumorbiologische Prozesse wie Neoangiogenese, Proliferation, Metastasierung und lokale Entzündungsreaktion ein und kommt als potentiell Therapieziel in Frage. In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob die Expression der Angiotensin II-Rezeptoren Typ 1 und 2 sowie vom Mas-Rezeptor im Biopsat mit der Expression im korrespondierenden Resektat eines Magenkarzinoms korreliert und ob der Nachweis der Rezeptoren im Biopsat mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika, die am Resektat erhoben werden, korreliert. Die Studienergebnisse würden Aufschluss darüber liefern, ob das lokale Angiotensin II-System prognostische und prädiktive Bedeutung für die Behandlung des Magenkarzinoms hat.

Um die oben genannten Fragen zu beantworten, wurden aus dem Institut für Pathologie der Charité Berlin alle Magenkarzinomfälle vom intestinalen Typ herausgesucht, bei denen sowohl ein Tumorbiopsat vor der onkologischen Resektion als auch ein Tumorsektat vorlagen. An den Tumorbiopsaten und Tumorsektaten wurden anschließend mit Hilfe der Immunhistochemie die Angiotensin II-Rezeptoren Typ 1 und 2 sowie der Mas-Rezeptor nachgewiesen und deren Expression mit klinisch-pathologischen Patientencharakteristika verglichen.

Insgesamt konnten aus 1300 Fällen mit histologisch gesichertem Magenkarzinom 35 Patienten identifiziert werden, bei denen sowohl tumorhaltige Biopsate als auch Magenkarzinomresektate vorlagen. Die immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis von AT1R, AT2R und Mas-Rezeptor wurden an formalinfixiertem, paraffineingebettetem Gewebe durchgeführt.

Eine Expression von AT1R wurde in 25 Resektaten und in 19 Biopsaten nachgewiesen. Eine Immunreaktion für AT2R zeigte sich bei 25 Resektaten und 23 Biopsaten. Insgesamt zeigten 27 Resektate und 26 Biopsate eine positive Immunreaktivität für den Mas-Rezeptor. Bei allen untersuchten Rezeptoren konnte in eine membranständige und in eine zytoplasmatische Immunreaktion unterschieden werden.

Der Vergleich der Immunreaktion (Cut-off 0) von AT1R in Resektat und Biopsat erbrachte eine signifikante Korrelation ($p < 0,02$). Für AT2R konnte eine Korrelation der Expression (Cut-off 0) zwischen Resektat und Biopsat im Grenzbereich des Signifikanzniveaus ($p < 0,059$) festgestellt werden, bei der Auswertung der Cut-off-3-Werte

wurde Signifikanz ($p < 0,01$) erreicht. Der statistische Vergleich der Expression vom Mas-Rezeptor in Resektat und Biopsat zeigte keine Übereinstimmung.

Die Überprüfung der Korrelation der Angiotensin II-Rezeptoren mit den Lymphknotenbefunden konnte die Beobachtungen vorangegangener Studien nicht bestätigen. Zum einen korrelierten Lymphknotenmetastasen (Cut-off 3) mit dem Fehlen einer AT1R-Expression in Resektaten ($p < 0,005$) und Biopsaten ($p < 0,022$), ebenfalls gab es eine signifikante Beziehung zwischen einer positiven AT1R-Immunreaktion (Cut-off 3) bei den Resektaten ($p < 0,003$) und der N0-Gruppe. Zum anderen korrelierte der Nachweis von AT2R in den Biopsaten (Cut-off 0: $p < 0,034$; Cut-off 2: $p < 0,041$; Cut-off 3: $p < 0,011$) signifikant mit fehlenden Lymphknotenmetastasen (N0). Die statistischen Untersuchungen wiesen einen signifikanten Zusammenhang zwischen AT1R-Nachweis und Nodalstatus nach, wenngleich mit einer inversen Korrelation. Weitergehende Untersuchungen zu Funktionsstatus und interzellulärer Verteilung des Rezeptors sollten eine differenzierte Betrachtung der AT1R-Expression ermöglichen. Beim statistischen Vergleich der AT2R-Expression in den Biopsaten mit den N-Kategorien korrelierte AT2R-negativ mit N2 (Cut-off 3: $p < 0,034$) und AT2R-positiv mit N0 (Cut-off 0: $p < 0,029$).

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass der immunhistochemische Nachweis von AT1R und AT2R im Tumorbiopsat signifikant mit der Expression am Resektat korreliert und prinzipiell an Hand eines Biopsates bestimmt werden kann. Inwieweit AT1R und AT2R als prognostische und prädiktive Biomarker geeignet sind, müssen weitere Studien validieren.

Die Untersuchung der Expression des Mas-Rezeptors erbrachte keine signifikanten Ergebnisse.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

Asaka M, Kimura T, Kudo M, Takeda H, Mitani S, Miyazaki, et al. Relationship of *Helicobacter pylori* to serum pepsinogens in an asymptomatic Japanese population. *Gastroenterology* 1992; **102**: 760-766

Barreto-Zuniga R, Maruyama M, Kato Y, Aizu K, Ohta H, Takekoshi T, et al. Significance of *Helicobacter pylori* infection as a risk factor in gastric cancer: serological and histological studies. *J Gastroenterol* 1997; **32**: 289-294

Berrino F, Copocaccia R, Esteve J. Survival of Cancer Patients in Europe: The EURO CARE-2 Study. IARC Scientific Publications No. 151. Lyon: IARC, 1999

Blaser MJ. Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. *J Infect Dis* 1999; **179**: 1523-1530

Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Munoz JM. The substance causing renal hypertension. *J Physiol* 1940; **98**: 283-298.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; **348**: 1625-1638

Chao A, Thun MJ, Henley SJ, Jacobs EJ, McCullough ML, Calle EE. Cigarette smoking, use of other tobacco products and stomach cancer mortality in US adults: The Cancer Prevention Study II. *Int J Cancer* 2002; **101**: 380-389

Chow WH, Blot WJ, Vaughan TL, Risch HA, Gammon MD, Stanford JL, et al. Body mass index and risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst* 1998; **90**: 150-155

Chung O, Unger T. Angiotensin II receptors in the kidney. *Kidney Blood Press Res* 1998; **21**: 245-248

Clark GW, Smyrk TC, Burdiles P, Hoefft SF, Peters JH, Kiyabu M, et al. Is Barrett's metaplasia the source of adenocarcinomas of the cardia? *Arch Surg* 1994; **129**: 609-614

Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: state of the art. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; **5**: 477-481

Culmann J, Baulmann J, Blume A, Unger T. The renin-angiotensin system in the brain: an update. *JRAAS* 2001; **2**: 96-102

- Curnow KM**, Pascoe L, White PC. Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol Endocrinol* 1992; **6**:1113–1118.
- De Gasparo**, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 2000; **52**: 415-72
- De Paepe B**, Valerie LRM, Verstraeten VL, De Potter CR, Bullock GR. Increased angiotensin II type-2 receptor density in hyperplasia, DCIS and invasive carcinoma of the breast is paralleled with increased iNOS expression. *Histochem Cell Biol* 2002; **117**: 13–19
- De Peape B**, Verstraeten VL, De Potter CR, Vakaet LA, Bullock GR. et al. Growth stimulatory angiotensin II type 1 receptor is upregulated in breast hyperplasia and in situ carcinoma but not in invasive carcinoma. *Histochem Cell Biol* 2001; **116**: 247-354
- Della Bruna R**, Ries S, Himmelstoss C and Kurtz A. Expression of cardiac angiotensin II AT1 receptor genes in rat hearts is regulated by steroids but not by angiotensin II. *J Hypertens* 1995; **13**: 763–769.
- Deshayes F**, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends Endocrinol Metab* 2005; **16**: 293-299
- Dooley CP**, Cohen H, Fitzgibbons PL, Bauer M, Appleman MD, Perez-Perez GI, et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection and histologic gastritis in asymptomatic persons. *N Engl J Med* 1989; **321**: 1562-1566
- Egami K**. Murohara T, Shimada T, et al. Role of host angiotensin II type 1 receptor in tumor angiogenesis and growth. *J. Clin. Invest.* 2003; **112**: 67
- EI-Serag HB**, Mason AC, Petersen N, Key CR. Epidemiological differences between adenocarcinoma of the gastric cardia in the USA. *GUT* 2002; **50**: 368-372
- EI-Serag HB**, Sonnenberg A, Jamal MM, Inadomi JM, Crooks LA, Feddersen RM. Corpus gastritis is protective against reflux oesophagitis. *Gut* 1999; **45**: 181-185
- Faive J**, Forman D, Esteve J, Gatta G. Survival of patients with oesophageal and gastric cancers in Europe. *Eur J Cancer* 1998; **34**: 2167-2175
- Feldman RA**. Epidemiologic observations and open questions about disease and infection caused by *Helicobacter pylori*. In: Achtman M, Serbaum S. *Helicobacter pylori*: Molecular and Cellular Biology. Wymondham: Horizon Scientific 2001: 29-51
- Fielding JWL**, Powell J, Allum WH. Cancer of the Stomach. London: The Macmillan Press 1989

Forman D, Newell DG, Fullerton F, Yarnell JW, Stacey AR, Wald N, et al. Association between infection with *Helicobacter pylori* and risk of gastric cancer: evidence from a prospective investigation. *BMJ* 1991; **302**: 1302-1305

Fox JG, Dangler CA, Tayler NS, King A, Koh TJ, Wang TC. High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances *Helicobacter pylori* colonization in C57BL/6 mice. *Cancer Res* 1999; **59**: 4823-4828

Friis S, Sorensen HT, Mellekjær L, McLaughlin JK, Nielsen GL, Blot WJ, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and the risk of cancer: a population-based cohort study in Denmark. *Cancer* 2001; **92**: 2462–2470

Fujita M, Hayashi I, Yamashina S, Fukamizu A, Itoman M, Majima M. Angiotensin type 1a receptor signaling-dependent induction of vascular endothelial growth factor in stroma is relevant to tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Carcinogenesis*. 2005; **26**: 271-279

Fujita M, Hayashi I, Yamashina S, Fukamizu A, Itoman M, Majima M. Blockade of angiotensin AT1a receptor signaling reduces tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **294**: 441–447

Gonzalez CA, Pera G, Agudo A, Palli D, Krogh V, Vineis P, et al. Smoking and the risk of gastric cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Int J Cancer* 2003; **107**: 629-634

Greco S, Muscella A, Elia MG, Salvatore P, Storelli C, Mazzotta A, et al. (2003) Angiotensin II activates extracellular signal regulated kinase via protein kinase C and epidermal growth factor receptor in breast cancer cells. *J Cell Physiol* 2003; **196**: 370–377

Guo DF, Inagami T. Epidermal growth factor-enhanced human angiotensin II type 1 receptor. *Hypertension* 1994; **23**:1032–1035.

Hansson LE, Engstrand L, Nyren O, Evans DJ Jr, Lindgren A, Bergstrom R, Andersson B, et al. *Helicobacter pylori* infection: independent risk indicator of gastric adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1993; **105**: 1098-1103

Hein L, Barsh GS, Pratt RE, Dzau VJ, Kobilka BK. Behavioral and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* 1995; **377**: 744-747

Helicobacter and Cancer Collaborative Group. Gastric cancer and *Helicobacter pylori*: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts. *Gut* 2001; **34**: 347-353

Hoshiyama Y, Kawaguchi T, Miura Y, Mizoue T, Tokui N, Yatsuya H, et al. A prospective study of stomach cancer death in relation to green tea consumption in Japan. *Br J Cancer* 2002; **87**: 309-313

Howson CP, Hiyama T, Wynder WL. The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol Rev* 1986; **8**: 1-27

Hsing AW, Hansson LE, McLaughlin JK, Nyren O, Blot WJ, Ekblom A, et al. Pernicious anemia and subsequent cancer. A population-based cohort study. *Cancer* 1993; **71**:745-750

Hu PJ, Mitchell HM, Li YY, Zhou MH, Hazell SL. Association of *Helicobacter pylori* with gastric cancer and observations on the detection of this bacterium in gastric cancer cases. *Am J Gastroenterol* 1994; **89**: 1806-1810

IARC Unit of Descriptive Epidemiology: WHO cancer mortality databank. Cancer Mondial, 2001; at: <http://www-dep.iarc.fr/ataava/globocan/who.htm>

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, Liver Flukes, and *Helicobacter pylori*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1994: 177-240

Ichiki T, Takeda K, Tokunou T, et al. Reactive oxygen species-mediated homologous downregulation of angiotensin II type I receptor mRNA by angiotensin II. *Hypertension* 2001; **37**: 535-540

Ichiki T, Usui M, Kato M, Funakoshi Y, Ito K, Egashira K, Takeshita A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptor gene transcription by nitric oxide. *Hypertension* 1998; **31**:342-348.

Ishaq S, Jankowski JA. Barrett's metaplasia: clinical implications. *World J Gastroenterol* 2001; **7**: 563-565

Juillerat-Jeanneret L, Celerier J, Chapuis Bernasconi C, Nguyen G, Wostl W, Maerki HP et. al. Renin and angiotensinogen expression and functions in growth and apoptosis of human glioblastoma. *Br J Cancer* 2004; **90**: 1059-1068

Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 Receptors: Regulation, Signaling and Function. *Blood Pressure* 2003; **12**: 70-80

Kijima K, Matsubara H, Murasawa S, Maruyama K, Ohkubo N, Mori Y, et al. Regulation of angiotensin II type 2 receptor gene by the protein kinase C- calcium pathway. *Hypertension* 1996; **27**: 529-534

Kikuchi S, Wada O, Nakajima T, Nishi T, Kobayashi O, Konishi T, et al. Serum anti-*Helicobacter pylori* antibody and gastric carcinoma among young adults. Research Group on Prevention of Gastric Carcinoma among Young Adults. *Cancer* 1995; **75**: 2789-2793

Koh W. Yuan JM., Sun CL., van den Berg D, Seow A, Lee HP., Yu MC. Angiotensin I-converting Enzyme (ACE) gene polymorphisms and breast cancer risk among Chinese women in Singapore. *Cancer Res.* 2003; **63**: 573-578

Koike T, Ohara S, Sekine H, Iijima K, Abe Y, Kato K, et al. Shimosegawa T. *Helicobacter pylori* infection prevents erosive reflux oesophagitis by decreasing gastric acid secretion. *Gut* 2001; **49**: 330-334

Koizumi Y, Tsubono Y, Nakaya N, Kuriyama S, Shibuya D, Matsuoka H, et al. Cigarette smoking and the risk of gastric cancer: a pooled analysis of two prospective studies in Japan. *Int J Cancer* 2004; **112**: 1049-1055

Kokkola A, Valle J, Haapiainen R, Sipponen P, Kivilaakso E, Puolakkainen P. *Helicobacter pylori* infection in young patients with gastric carcinoma. *Scand J Gastroenterol* 1996; **31**: 643-647

Lafamme L, de Gasparo M, Gallo JM, Payet MD and Gallopayet N. Angiotensin II induction of neurite outgrowth by AT2 receptors in NG108-15 cells – effect counteracted by the AT1 receptors. *J Biol Chem* 1996; **271**: 22729–22735

Lagergren J, Bergstrom R, Nyren O. Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann Intern Med* 1999; **130**: 883-890

Laine L, Sugg J. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on development of erosive esophagitis and gastroesophageal reflux disease symptoms: a post hoc analysis of eight double blind prospective studies. *Am J Gastroenterol* 2002; **97**: 2992-2997

Laragh JH. Two forms of vasoconstriction in systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1987; **60**: 82-93

Laurén T. The two histologic main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; **23**: 317-329

Lever A, et al. Do Inhibitors of Angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* 1998; **352**: 179-152

Levine PH, Stemmermann G, Lennette ET, Hildesheim A, Shibata D, Nomura A. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus prior to the diagnosis of Epstein-Barr-virus-associated gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* 1995; **60**: 642-644

Li C, Malone KE, Weiss NS, Boudreau DM, Cushing-Haugen KL, Daling JR. Relation between use of antihypertensive medications and risk of breast carcinoma among women ages 65–79years. *Cancer* 2003; **98**: 1504–1513

Lindholm L. Anderson H, Ekblom T, et al. Relation between drug treatment and cancer in hypertensives in the Swedish Trial in Old Patients with Hypertension 2: a 5-year, prospective, randomized, controlled trial. *Lancet* 2001; **358**: 539–544

Lissowska J, Groves FD, Sobin LH, Fraumeni JF Jr, Nasierowska-Guttmejer A, Radziszewski J, et al. Family history and risk of stomach cancer in Warsaw, Poland. *Eur J Cancer Prev* 1999; **8**: 223-227

- Magaldi AJ**, Cesar KR, Araujo M, et al. Angiotensin-(1–7) stimulates water transport in rat inner medullary collecting duct: evidence for involvement of vasopressin V2 receptors. *Pflugers Arch* 2003; **447**: 223–230.
- Makita N**, Iwai N, Inagami T, Badr KF. Two distinct pathways in the down-regulation of typ-1 angiotension II receptor gene in rat glomerular mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; **185**: 142-146
- Mancania R**, Susini T, Renzetti A, Forti G, Razzoli E, Serio M, Maggi M. Sex steroid modulation of AT2 receptors in human myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; **81**: 1753-1767
- Manes G**, Mosca S, De Nucci C, Lombardi G, Lioniello M, Balzano A. High prevalence of reflux symptoms in duodenal ulcer patients who develop gastro-oesophageal reflux disease after curing *Helicobacter pylori* infection. *Dig Liver Dis* 2001; **33**: 665-670
- Marshall BJ**, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; **1**: 1311-1315
- Matsubara H**, Inada M. Molecular insights into angiotensin II type 1 and type 2 receptors: expression, signaling and physiological function and clinical application of its antagonists. *Endocr J* 1998; **45**: 137-150
- McColl KE**, Dickson A, El-Nujumi A, El-Omar E, Kelman A. Symptomatic benefit 1-3 years after H pylori eradication in ulcer patients: impact of gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2000; **95**: 101-105
- McMichael AJ**, McCall MG, Hartshorne JM, Woodings TL. Patterns of gastro-intestinal cancer in European migrants to Australia: the role of dietary change. *Int J Cancer* 1980; **25**: 431-437
- Miehlke S**, Hackelsberger A, Meining A, von Arnim U, Muller P, Ochsenkuhn T, et al. Histological diagnosis of *Helicobacter pylori* gastritis is predictive of a high risk of gastric carcinoma. *Int J Cancer* 1997; **73**: 837-839
- Munoz N**, Correa P, Cuello C, Duque E. Histologic types of gastric carcinoma in high- and low-risk areas. *Int J Cancer* 1968; **3**: 809-818
- Munoz N**. Gastric Carcinogenesis: proceedings of the 6th Annual Symposium of the European Organization for Cooperation in Cancer Prevention Studies (ECP). Amsterdam: Elsevier Science, 1988: 51-69
- Munzenmaier DH**, Green AS. (1999) Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension* 1996; **27**: 760–765
- Nagano J**, Kono S, Preston DL, Mabuchi K. A prospective study of green tea consumption and cancer incidence, Hiroshima and Nagasaki (Japan). *Cancer Causes Control* 2001; **12**: 501-508
- Nakajima M**, Mukoyama M, Pratt RE, Horiuchi M, Dzau VJ. Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **197**: 393–399.

Nickenig G, Roling J, Strehlow K, Schnabel P and Bohm M. Insulin induces upregulation of vascular AT1 receptor gene expression by posttranscriptional mechanisms. *Circulation* 1998; **98**: 2453–2460.

Noll S, Schaub-Kuhnen. Praxis der Immunhistochemie. München Jena: Urban & Fischer, 2000

Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, Kato I, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N Engl J Med* 1991; **325**: 1132-1136

Nomura A. Stomach Cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF, eds. Cancer Epidemiology and Prevention. 2nd ed. New York, NY: Oxford University Press, 1966: 707-724

Nomura AM, Stemmermann GN, Chyou PH. Gastric cancer among the Japanese in Hawaii. *Jpn J Cancer Res* 1995; **86**: 916-923

Nouet S, Amzallag N, Li JM, Louis S, Seitz I, Cui TX, et al. Trans-inactivation of receptor tyrosine kinases by novel angiotensin II AT2 receptor-interacting protein, ATIP. *J Biol Chem* 2004; **279**: 28989–28997

Nouet S, Nahmias C. Signal transduction from the angiotensin AT2 receptor. *Trends Endocrinol Metab* 2000; **11**:1-6

Page IH, Helmer OM. A crystalline pressor substance (angiotonin) resulting from the reaction between renin and renin activator. *J Exp Med* 1940; **71**: 29–42.

Palli D, Galli M, Caporaso NE, Cipriani F, Decarli A, Saieva C, et al. Family history and risk of stomach cancer in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; **3**: 15-18

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993; **54**: 594-606

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J. Cancer Incidence in Five Continents, vol VII. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 1997: 822-823

Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, et al. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 1991; **325**:1127-1131

Parsonnet J. The incidence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 1995; **9 Suppl 2**: 45-51

Pinheiro SV, Simões e Silva AC, Sampaio WO, et al. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1–7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension* 2004; **44**: 490–496.

Raghunath A, Hungin AP, Wooff D, Childs S. Prevalence of *Helicobacter pylori* in patients with gastro-oesophageal reflux disease: systematic review. *BMJ* 2003; **326**: 737

- Ries LAG**, Kosary CL, Hankey BF. SEER Cancer Statistic Review 1973-1994, National Cancer Institute, NIH Publication No. 97-2789. Bethesda: Department of Health and Human Services, 1997
- Röcken C**, Lendeckel U, Dierkes J, Westphal S, Carl-McGrath S, Peters B, et al. The number of lymph node metastases in gastric cancer correlates with the angiotensin I-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism. *Clin. Cancer Res.* 2005; **11**: 2526-2530
- Röcken C**, Neumann U, Ebert MPA. Neue Wege zur Früherkennung, Prognoseabschätzung und Therapie maligner Tumore des Gastrointestinaltraktes. *Zeitschrift für Gastroenterologie.* 2008; **46**: 216-222
- Röcken C**, Röhl FW, Diebler E, Lendeckel U, Pross M, Carl-McGrath S, et al. The Angiotensin II/Angiotensin II Receptor System Correlates with Nodal Spread in Intestinal Typ Gastric Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; **16(6)**: 1206-1212
- Roukos DH**. Current status and future perspectives in gastric cancer management. *Cancer Treat Rev.* 2000 Aug; **26(4)**: 243-55
- Santos RAS**, Ferreira AJ. Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2007; **16**: 122-128
- Santos RAS**, Simões e Silva AC, Maric C, et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 8258–8263
- Sasaki A**, Haruma K, Manabe N, Tanaka S, Yoshihara M, Chayama K. Long-term observation of reflux oesophagitis developing after *Helicobacter pylori* eradication therapy. *AlimentPharmacol Ther* 2003; **17**: 1529-1534
- Sipponen P**, Kosunen TU, Valle J, Riihela M, Seppala K. *Helicobacter pylori* infection and chronic gastritis in gastric cancer. *J Clin Pathol* 1992; **45**: 319-323
- Stalnikowicz R**, Benbassat J. Risk of gastric cancer after gastric surgery for benign disorders. *Arch Intern Med* 1990; **150**: 2022-2026
- Stewart BW**, Kleihues P. World Cancer Report. Lyon: IARC Press, 2003
- Stoll M**, Staeckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J. Clin Invest* 1995; **95**: 681-687.
- Suganuma T**. Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Nagasaka T, Mizutani S, et al. Functional expression of the angiotensin II type 1 receptor in human ovarian carcinoma cells and its blockade therapy resulting in suppression of tumor invasion, angiogenesis, and peritoneal dissemination. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 2686–2694

Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE. Angiotensin-(1–7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; **289**: H1560–H1566.

Tea BS, Der Sarkissian S, Hamet P and Deblois D. Proapoptotic and growth-inhibitory role of angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats *in vivo*. *Hypertension* 2000; **35**: 1069-1073.

Thompson DE, Mabuchi K, Ron E, Soda M, Tokunaga M, Ochikubo S, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors, 1958-1987. *Radiat Res* 1994; **137**: S17-S67

Tredaniel J, Boffetta P, Buiatti E et al. Tobacco smoking and gastric cancer: review and meta-analysis. *Int J Cancer* 1997; **72**: 565-573

Tsubono Y, Nishino Y, Komatsu S, Hsieh CC, Kanemura S, Tsuji I, et al. Green tea and the risk of gastric cancer in Japan. *N Engl J Med* 2001; **344**: 632-636

Uemura H. Ishiguro H, Nakaigawa N, Nagashima Y, Miyoshi Y, Fujinami K, et al. Angiotensin II receptor blocker shows antiproliferative activity in prostate cancer cells: a possibility of tyrosine kinase inhibitor of growth factor. *Mol. Cancer Ther* 2003; **2**: 1139–1147

Unger T. The angiotensin type 2 receptor: Variations on an enigmatic theme. *J Hypertens* 1999; **17**: 1775–1786.

Vakil N, Hahn B, McSorley D. Recurrent symptoms and gastro-oesophageal reflux disease in patients with duodenal ulcer treated for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; **14**: 45-51

Vaughan TL, Davis S, Kristal A, Thomas DB. Obesity, alcohol, and tobacco as risk factors for cancers of the esophagus and gastric cardia: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; **4**: 85-92

Verdecchia A, Corazzari I, Gatta G, Lisi D, Faivre J, Forman D. Explaining gastric cancer survival differences among European countries. *Int J Cancer* 2004; **109**: 737-741

Wang DH. Qiu J, Hu Z. Differential regulation of angiotensin II receptor subtypes in the adrenal gland: role of aldosterone. *Hypertension* 1998; **32**: 65-70

Wang ZY, Cheng SJ, Zhou ZC, Athar M, Khan WA, Bickers DR, et al. Antimutagenic activity of green tea polyphenols. *Mutat Res* 1989; **223**: 273-285

Wang ZY, Hong JY, Huang MT, Reuhl KR, Conney AH, Yang CS. Inhibition of N-nitrosodiethylamine- and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced tumorigenesis in A/J mice by green tea and black tea. *Cancer Res* 1992; **52**: 1943-1947

Warburton-Timms VJ, Charlett A, Valori RM, Uff JS, Shepherd NA, Barr H, et al. The significance of cagA(+) *Helicobacter pylori* in reflux oesophagitis. *Gut* 2001; **49**: 341-346

Wruck C. Funke-Kaiser H, Pufe T, Kusserow H, Menk M, Scheffe JH, et al. Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; **25**: 57-64

Wyse B, Sernia C. Growth hormone regulates AT-1a angiotensin receptors in astrocytes. *Endocrinology* 1997; **138**: 4176-4180.

Xu Y, Ho CT, Amin SG, Han C, Chung FL. Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Res* 1992; **52**: 3875-3879

Yamamoto S. Stomach cancer incidence in the world. *Jpn J Clin Oncol* 2001; **31**: 471

6.2 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
ACE 2	Angiotensin-Converting-Enzym 2
A-LAP	<i>adipocytederived leucine aminopeptidase</i>
Ang(1-7)	Angiotensin(1-7)
Ang II	Angiotensin II
AP-1	Aktivatorprotein 1
AT1R	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
AT2R	Angiotensin II-Rezeptor Typ 2
ATIP	AT2-interagierende Proteine
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DAG	Diacylglycerol
DCIS	duktales carcinoma in situ
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
eNOS	endotheliale Stickoxidsynthase
ERK	<i>extracellular signal - regulated kinase</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GERD	Gastroösophageale Refluxkrankheit
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
IP ₃	Inosittriphosphat
IRS	Immunreaktivitäts-Score
JAK	<i>Janus cytosolic protein kinase</i>
LAS	lokales Angiotensin-System
LDL	Lipoprotein geringer Dichte
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>

MKP-1	MAP-Kinase-Phosphatase 1
NO	Stickstoffmonoxid
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor-1
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PTPase	Protein-Phosphotyrosin-Phosphatase
RAS	Renin-Angiotensin System
ROS	Sauerstoffradikale
SHP-1	<i>SH2-domain containing phosphatase 1</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
UICC	<i>International Union Against Cancer</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGF R2	VEGF –Rezeptor Typ 2
WHO	Weltgesundheitsorganisation
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
Zfhep	<i>zincfinger homoeo-domain enhancer binding protein gene</i>

6.3 Danksagung

Ich danke allen Personen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christoph Röcken für die Überlassung des Themas und die persönliche Betreuung sowie für die kritische Begleitung bei der Umsetzung der Arbeit.

Für die freundliche Bereitstellung der Antikörper danke ich Herrn Prof. Dr. med. Stefan Schulz und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Uwe Lendeckel.

Frau Sandra Krüger und den anderen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Medizinischen Fakultät Charité möchte ich für die Unterstützung bei den Labor- und Archivarbeiten danken.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung danke ich Herrn Dr. rer. nat. Jan Budczies.

Meinen Eltern danke ich, dass sie diese Arbeit neben meiner Assistenz Tätigkeit ermöglichen.

Meiner Frau Susanne danke ich für die private und berufliche Unterstützung.

6.4 Erklärung

„Ich, Alexander Liebig, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Expression der Angiotensin II-Rezeptoren im Magenkarzinom - Vergleich des immun-histologischen Nachweises zwischen Magenschleimhautbiopsat und Magenresektat“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

6.5 Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."