

Aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen

**Immunhistochemische Evaluation der Proteinexpression
verschiedener Somatostatin-Rezeptoren beim
muskelinfiltrierenden Harnblasenkarzinom mittels der Tissue
Microarray Technik**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Mayer, Lisa

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Todenhöfer

2. Berichterstatter: Professor Dr. N. Popov

Tag der Disputation: 05.03.2021

Für Lena

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Harnblasenkarzinom.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren.....	2
1.1.3	Klinik.....	3
1.1.4	Pathologie.....	4
1.1.5	Staging.....	4
1.1.6	Grading.....	6
1.1.7	Rezidiv- und Progressionsverhalten.....	8
1.1.8	Diagnostik.....	9
1.1.9	Therapie.....	11
1.1.9.1	Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms....	11
1.1.9.2	Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms.....	12
1.2	Somatostatin und seine Rezeptoren.....	14
1.2.1	Somatostatin.....	14
1.2.2	Somatostatin-Analoga und Konjugate.....	15
1.2.3	Somatostatinrezeptoren.....	17
1.2.3.1	Nachweis.....	18
1.3	Fragestellung der vorliegenden Arbeit.....	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Patienten.....	20
2.1.1	Ausschlusskriterien.....	21
2.2	Tissue Microarrays.....	21
2.3	Immunhistochemie.....	23
2.3.1	Methode.....	23
2.3.2	Labelled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode.....	24
2.3.3	Durchführung der Immunhistochemie.....	26
2.3.3.1	Färbeprotokoll gegen SSTR1, SSTR2, SSTR3 und SSTR4 ...	26
2.3.3.2	Färbeprotokoll gegen SSTR5.....	29
2.4	Beurteilung des Expressionsverhaltens.....	30
2.4.1	Evaluationskriterien für die Auswertung.....	31
2.4.1.1	Zytoplasmatische Rezeptoren.....	32
2.4.1.2	Membranständige Rezeptoren.....	32
2.4.1.3	Nukleäre Rezeptoren.....	33

2.5	Statistische Auswertungen der Datenbank.....	33
2.6	Ethik	34
2.7	Datenschutz	35
2.8	Verwendete Software	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Patientenkollektiv.....	36
3.1.1	Patientendaten	36
3.1.2	Tumorklassifikation	36
3.2	Immunhistochemische Ergebnisse	38
3.2.1	SSTR1	38
3.2.1.1	Statistische Kenngrößen	39
3.2.1.2	Vergleich der membranösen Expression in Normal- und Tumorgewebe.....	39
3.2.1.3	Vergleich der zytoplasmatischen Expression in Normal- und Tumorgewebe.....	40
3.2.1.4	Korrelation mit TNM-Klassifikation und Grading	41
3.2.2	SSTR2	46
3.2.2.1	Statistische Kenngrößen	46
3.2.2.2	Vergleich der membranösen Expression in Normal- und Tumorgewebe.....	46
3.2.2.3	Vergleich der zytoplasmatischen Expression in Normal- und Tumorgewebe.....	47
3.2.2.4	Korrelation mit TNM-Klassifikation und Grading	48
3.2.3	SSTR3	52
3.2.3.1	Statistische Kenngrößen	52
3.2.3.2	Vergleich der membranösen Expression in Normal- und Tumorgewebe.....	53
3.2.3.3	Vergleich der zytoplasmatischen Expression in Normal- und Tumorgewebe.....	53
3.2.3.4	Korrelation mit TNM-Klassifikation und Grading	54
3.2.4	SSTR4	59
3.2.4.1	Statistische Kenngrößen	59
3.2.4.2	Vergleich der membranösen Expression in Normal- und Tumorgewebe.....	60
3.2.4.3	Vergleich der zytoplasmatischen Expression in Normal- und Tumorgewebe.....	60
3.2.4.4	Korrelation mit TNM-Klassifikation und Grading	61
3.2.5	SSTR5	66

3.2.5.1	Statistische Kenngrößen	66
3.2.5.2	Vergleich der membranösen Expression in Normal- und Tumorgewebe.....	66
3.2.5.3	Vergleich der zytoplasmatischen Expression in Normal- und Tumorgewebe.....	67
3.2.5.4	Korrelation mit TNM-Klassifikation und Grading	68
3.2.6	Interaktion der SSTR-Subtypen in Tumorgewebe	73
3.2.6.1	Membranständige SSTR.....	73
3.2.6.2	Zytoplasmatische SSTR.....	75
3.2.7	Korrelation mit demographischen Daten	79
3.2.7.1	Alter.....	79
3.2.7.2	Geschlecht.....	84
3.2.8	Korrelation mit dem Krankheitsverlauf	89
3.2.8.1	Rezidiv	89
3.2.8.2	Tumorspezifisches Überleben	95
3.2.8.3	Gesamtüberleben	101
3.2.9	Univariate Analysen	108
3.2.9.1	Rezidivfreie Zeit.....	108
3.2.9.2	Tumorspezifisches Überleben	108
3.2.9.3	Gesamtüberleben.....	109
3.2.10	Multivariate Analysen	110
3.2.10.1	Rezidivfreie Zeit.....	110
3.2.10.2	Tumorspezifisches Überleben	112
3.2.10.3	Gesamtüberleben	113
4	Diskussion	116
5	Zusammenfassung	127
6	Anhang	130
	Abkürzungen	130
	Danksagung	133
	Literaturverzeichnis.....	134
	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	145
	Veröffentlichungen	146

1 Einleitung

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Beim Harnblasenkarzinom handelt es sich zumeist um Urothelkarzinome, die nicht selten gleichzeitig an verschiedenen Stellen der Blase und ableitenden Harnwegen vorkommen. Das Harnblasenkarzinom zählt weltweit zu den häufigsten malignen Tumorerkrankungen.

Die Inzidenz für einen Harnblasentumor in Europa betrug 2012 für Männer 6,5% und ist damit in Europa nach Prostata-, Lungen- und Kolorektaltumoren die vierthäufigste Tumorart (Ferlay et al., 2013). Die geschätzte Zahl der Neuerkrankungen an Harnblasentumoren im Jahr 2014 in den USA lag bei 74.690 Patientinnen und Patienten. Über zwei Drittel davon, nämlich 56.390 der Fälle, waren Männer. Etwas mehr als 15.500 Patienten verstarben an Tumoren der Harnblase, davon mehr als 11.100 Männer (Siegel, Ma, Zou, & Jemal, 2014). Das Erkrankungsrisiko steigt mit dem Alter kontinuierlich an, was zeigt, dass es sich beim Harnblasenkarzinom um eine Erkrankung des Alters handelt. Dreiviertel aller Patienten sind über 65 Jahre alt, das mediane Alter zum Zeitpunkt der Diagnose ist 65 Jahre (Schmelz, 2014).

Die 5-Jahres-Prävalenz betrug für Deutschland im Jahr 2010 rund 46.700, wobei Männer über dreimal so häufig betroffen sind als Frauen (Koch-Institut, 2010). Auch bei der Erstdiagnose gibt es geschlechterspezifische Unterschiede. Wie in einer Studie mit 27.773 Patienten gezeigt werden konnte, sind Frauen, trotz geringerer Inzidenz, bei der Erstvorstellung in einem fortgeschritteneren Tumorstadium und haben im Vergleich zu Männern eine schlechtere Prognose (Waldhoer, Berger, Haidinger, Zielonke, & Madersbacher, 2015).

So befanden sich die Frauen gegenüber den Männern bei der Erstdiagnose in Deutschland 2009-2010 häufiger im Tumorstadium T2 (39% gegenüber 34%) und T3 (17% gegenüber 12%) und seltener im Stadium T1 (37% gegenüber 47%). Damit korrespondiert die höhere Überlebensrate der Männer (59%)

Einleitung

gegenüber den Frauen (50%) bis fünf Jahre nach der Erstdiagnose (Koch-Institut, 2010).

Die Fünf-Jahres-Überlebensrate lag von 2003-2009 in den USA bei 80%. Bei Männern über 80 Jahren stellt das Harnblasenkarzinom die vierthäufigste tumorbedingte Todesursache dar (Siegel et al., 2014). Über 5.500 Personen sterben in Deutschland pro Jahr an der Erkrankung (Li et al., 2014).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Zur Ätiologie des Harnblasenkarzinoms wird bereits seit Jahrzehnten Forschung betrieben. Bei der Entstehung handelt es sich wohl zumeist um ein Zusammenspiel von genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren (Burger et al., 2013). Etwa 25% der Harnblasenkarzinome werden durch Umweltfaktoren ausgelöst (Schmelz, 2014). Eine positive Familienanamnese erstgradiger Verwandter verdoppelt das Risiko, selbst an einem Urothelzellkarzinom zu erkranken (Aben et al., 2002).

Es gilt als gesichert, dass Zigarettenkonsum der wichtigste Risikofaktor für einen Blasentumor ist. Pathophysiologisch lässt sich dies durch die im Rauch enthaltenen und nachweislich kanzerogenen aromatischen Amine wie beispielsweise 2-Naphthylamin und Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe erklären (Burger et al., 2013; Vineis & Pirastu, 1997; Wynder & Goldsmith, 1977). Auch Passivraucher haben ein erhöhtes Risiko, an einem Harnblasenkarzinom zu erkranken, insbesondere nichtrauchende Frauen (Jiang, Yuan, Skipper, Tannenbaum, & Yu, 2007). Selbst das rezidivfreie Überleben nach transurethraler Resektion eines nicht-muskelinvasiven Harnblasentumors ist bei Rauchern und ehemaligen Rauchern verkürzt (Lammers et al., 2011).

Die berufsbedingte Karzinominduktion durch Exposition mit schädigenden Substanzen ist ein weiterer wichtiger Punkt. Dies trifft wohl auf etwa 7,1% der erkrankten Männer zu (Rushton et al., 2010). Besonders gefährdet sind beispielsweise Beschäftigte in der Farb-, Druck- und Aluminiumindustrie. Die lange Latenzzeit von 10 – 40 Jahren macht die Detektion der Noxen besonders schwierig. Auch folgende Medikamente werden mit der Ausbildung von Harnblasenkarzinomen in Verbindung gebracht: Chlornaphazin, Phenacetin und

Einleitung

Cyclophosphamid (Rübben, 2014). Auf genetischer Ebene wurde eine N-Acetyltransferasen- (NAT) Mutation detektiert, die eine langsamere Acetylierung und damit Entgiftung von aromatischen Aminen bewirkt. Patienten mit einer langsameren Acetylierung durch die NAT2 erkrankten häufiger an einem Harnblasenkarzinom (Stern et al., 2009). Eine Deletion im Gen für die Glutathion-S-Transferase (GST), die beispielsweise oxidativen Stress mindert, soll ebenso mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko zusammenhängen (Garcia-Closas et al., 2005).

Patienten mit Dauerkatheterableitung und insbesondere in Vergesellschaftung mit chronischen Harnwegsinfekten oder Steinleiden haben eine erhöhte Inzidenz des Harnblasenkarzinoms (Kantor et al., 1984). Für gewöhnlich handelt es sich hier um Plattenepithelkarzinome (Kaufman et al., 1977; Wynder & Goldsmith, 1977).

Die Bilharziose, verursacht durch eine Infektion mit *Schistosoma haematobium*, ist in großen Teilen Afrikas und in arabischen Ländern endemisch. Sie gilt dort, wohl als Zusammenspiel von mechanischer Reizung und der Bildung von Nitrosaminen, als Hauptursache für die Entstehung von Harnblasenkarzinomen (Burger et al., 2013; Hicks et al., 1977).

1.1.3 Klinik

Haupt- und Frühsymptom ist die schmerzlose Mikrohämaturie mit Makrohämaturieepisoden, die bei 85 % der Patienten zur Diagnose führen (Kirkali et al., 2005). 15-30% der Patienten mit einer Makrohämaturie und 2-10% mit Mikrohämaturie haben ein Harnblasenkarzinom. Allerdings besteht kein Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Hämaturie und dem Ausmaß der Tumorerkrankung (Schmelz, 2014). Weitere Symptome sind die Pollakisurie, Dysurie oder Flankenschmerzen (Kirkali et al., 2005). Das klinische Bild kann auch von einer obstruktiven Harnsymptomatik geprägt sein. Das Allgemeinbefinden ist oft lange unbeeinträchtigt und der Beginn schleichend, was die Diagnostik erschwert.

Einleitung

Ist das Karzinom schon weiter fortgeschritten, ist eine Obstruktion des Ureterostiums mit anschließender Hydronephrose möglich, in schweren Fällen bis hin zur Pyelonephritis.

Je nach Tumorstadium bzw. Infiltration oder Metastasierung sind auch andere Organe symptomatisch. Bei der Infiltration ins Rektum können Obstipationen oder Diarrhöen auftreten oder bei Herden in der Leber veränderte Leberenzyme. Metastasen in der Lunge verursachen Husten oder die ossäre Infiltration Knochenschmerzen. Weitere mögliche Prädilektionsstellen sind auch das ZNS und endokrine Organe wie Schilddrüse und Nebenniere (Schmelz, 2014).

1.1.4 Pathologie

Das Übergangsepithel (Urothel) ist das typische Epithel der ableitenden Harnwege und kleidet Nierenbecken, Ureter, Harnblase und proximale Urethra aus. Zu etwa 90% gehen Harnblasenkarzinome aus dem Übergangsepithel hervor, sogenannte Urothelkarzinome (Kirkali et al., 2005). Plattenepithelkarzinome machen etwa 5% aus und Adenokarzinome, die zu einem Drittel vom Urachus ausgehen und meist am Blasendach lokalisiert sind, sind mit 0,5-2% sehr selten (Schmelz, 2014). Urothelkarzinome sind vor allem an der Hinter- oder Seitenwand der Blase lokalisiert, etwa ein Viertel im Blasenhalbsbereich (Hautmann, 2010).

1.1.5 Staging

Das TNM-System der Union internationale contre le cancer (UICC) ist ein Grundgerüst für die Beurteilung der Prognose einer Tumorerkrankung. Die Festlegung der klinischen TNM-Kategorien (clinical- cTNM) erfolgt prätherapeutisch und ist ausschlaggebend für die Therapiewahl. Die pathohistologische Klassifizierung ist durch das Präfix „p“ (pathological- pTNM) gekennzeichnet und wesentlich für die Prognose des Harnblasenkarzinoms. Die Übereinstimmung von klinischem und pathologischem Staging ist schlecht (Staging error).

Einleitung

Beurteilt wird die lokale Ausbreitung des Primärtumors (Primärtumor, T), der Lymphknotenbefall (Nodes, N) und die Fernmetastasen (Metastasen, M; siehe Tab. 1). Der hauptsächliche noduläre Befall findet sich in der obturatorischen Region (74%) und im Bereich der A. iliaca externa (65%) (Schmelz, 2014).

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eines Urothelkarzinoms der Harnblase zeigen etwa 80% der Tumore ein oberflächliches, papilläres Wachstum (Metts, Metts, Milito, & Thomas, 2000). Nach der TNM-Klassifikation gehören dazu Ta und T1 Tumore und das Carcinoma in situ (CIS, Tis). Ta Tumore beschränken sich auf das Urothel und sind papillär aufgebaut. Das *Carcinoma in situ* hat einen flachen, nicht-papillären Aufbau und ist vermutlich eine „Vorläuferläsion“ des Urothelkarzinoms (Spruck et al., 1994). T1 Tumore infiltrieren das subepitheliale Bindegewebe. 10-15% der papillären Tumore entwickeln eine Progression mit muskelinvasivem Wachstum im weiteren Verlauf (Rübben, 2014)

20- 30% Tumore sind bereits bei der Erstdiagnose muskelinfiltrierend und weisen eine deutlich schlechtere Prognose auf (Rübben, 2014).

Fernmetastasen treten vor allem in Lunge, Leber und Knochen auf. Bei 5 – 20% der Patienten treten schon bei der Erstdiagnose Fernmetastasen auf (Metts et al., 2000). Lymphknotenmetastasen sind bei 25% der Patienten bei Erstdiagnose beschrieben (Wang et al., 2014).

T - Primärtumor	
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt auf einen Primärtumor
Ta	Nicht-invasives papilläres Karzinom
Tis	<i>Carcinoma in situ</i> : bei flachen (nicht-papillären) Tumoren
T1	Tumor infiltriert die Lamina propria
T2	Tumor infiltriert die Muskulatur
T2a	nur die oberflächliche Muskulatur (<50%)
T2b	infiltriert die tiefe Muskulatur (äußere Hälfte)
T3	Tumor infiltriert das perivesikale Fettgewebe
T3a	nur mikroskopische Infiltration des Fettgewebes

T3b	makroskopische Infiltration bzw. extravesikale Tumormasse
T4	Tumor infiltriert Nachbarorgane
T4a	Prostata, Uterus, Vagina
T4b	Becken- oder Abdominalwand
N – Lymphknotenmetastasen	
NX	Regionale Lymphknoten (LK) können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	Solitäre LK-Metastase (hypogastrisch, obturatorisch, externe iliakale oder präsakrale LK)
N2	Multiple LK-Metastasen (hypogastrisch, obturatorisch, externe iliakale oder präsakrale LK)
N3	LK-Metastasen entlang der Aa. iliaca communes
M - Fernmetastasen	
MX	Fernmetastasen nicht beurteilbar
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen nachgewiesen

Tab. 1: TNM-Stadien des Harnblasenkarzinoms.

1.1.6 Grading

Das Grading wird dazu benutzt, den Differenzierungsgrad eines Tumorgewebes, also seine Abweichung von normalem Gewebe, anzugeben. Bei der mikroskopischen Beurteilung wird auf wichtige Bestimmungsparameter wie Größe und Form der Zellkerne, die Teilungsaktivität und Ähnlichkeit zum Ursprungsgewebe geachtet.

Lange Zeit wurde das Grading-System (G1-3) der WHO-Klassifikation von 1973 verwendet (siehe Tab. 2).

Einleitung

Urothelpapillom	
Grade 1	gut differenziert
Grade 2	mäßig differenziert
Grade 3	schlecht differenziert

Tab. 2: Histopathologisches Grading, WHO-Klassifikation von 1973.

G0-Tumore (Papillome) werden laut dieser Klassifikation als gutartig eingestuft, ihre Zellschichten sind etwas vermehrt. Sie wachsen blumenkohlartig in das Blasenlumen und werden von normalem Epithel bedeckt. Das Epithel von G1-Tumoren ist noch gut differenziert, es liegt keine Polymorphie vor. G3-Tumore sind anaplastisch, niederdifferenziert, mit hochgradiger Kernpolymorphie und hohem Malignitätsgrad. G2-Tumore sind dazwischen einzuordnen (Hautmann, 2010).

Nach der WHO-Klassifikation von 2004 werden Harnblasenkarzinome in Low-grade- und High-grade-Tumore (LG und HG) eingeteilt (siehe Abb. 1). Hierbei wird getrennt zwischen genetisch stabilen und instabilen Tumoren. 70 – 80% sind genetisch stabil und haben eine gute Prognose, während 20 – 30% genetisch instabil sind und schnell muskelinvasiv werden (K. Lindemann-Docter, 2008). Papilläre Tumore, die hoch differenziert sind werden in der neuen Klassifikation als „papilläre urotheliale Neoplasie mit niedrig malignem Potenzial“ (PUNLMP) bezeichnet und nicht als maligne eingestuft. „Nicht-invasive Low-grade-Karzinome“ (NILGC) sind definiert als Tumore mit Textur- oder Schichtungsstörung des Urothels, bei denen noch eine deutliche Übereinstimmung zu normalem Urothel vorhanden ist.

Da das Gros der in der vorliegenden Arbeit benutzten Proben vor Einführung des neuen WHO-Gradings entnommen wurde, wurde hier auf das WHO-Grading von 1973 zurückgegriffen.

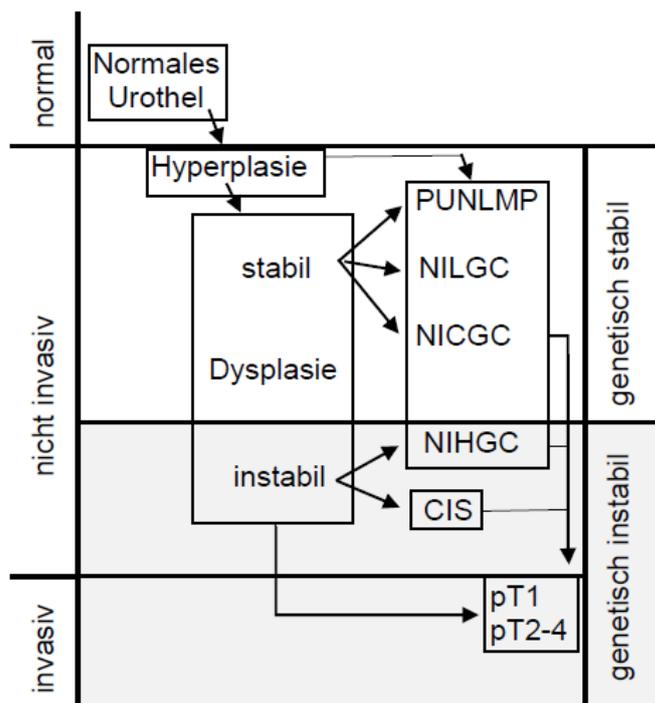


Abb. 1: Histopathologisches Grading, WHO-Klassifikation 2004. NIHGC= nichtinvasive high-grade-Tumore, restliche Begriffe siehe Text (modifiziert nach Hautmann, 2010).

1.1.7 Rezidiv- und Progressionsverhalten

Die wesentlichen prognostischen Faktoren für das Harnblasenkarzinom sind die Infiltrationstiefe und der Grad der Tumordifferenzierung (Metts et al., 2000). Auch der Resektionsstatus und Lymphknotenstatus sind wesentliche prognostische Faktoren (Stein et al., 2001)

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eines Urothelkarzinoms der Harnblase zeigen 80% der Tumore ein oberflächliches, papilläres Wachstum. Eine Metastasierung ist bei T0 und T1-Tumoren selten (Metts et al., 2000). Patienten mit oberflächlichen Tumoren (Ta-T1) bilden lediglich in 0,7% der Fällen Metastasen (Schmelz, 2014). Das Rezidivrisiko liegt allerdings trotz kompletter transurethraler Resektion (TUR) bei 60-80%. Davon erleiden 20% der Patienten einen Progress in einen muskelinvasiven Tumor. Sehr gefährlich sind auch multifokale Tumore mit Dysplasien oder einem CIS. Beim CIS besteht bei etwa 54% der Patienten die Gefahr, den Progress in einen muskelinvasiven Tumor zu erleiden (Babjuk et al., 2013).

Einleitung

Patienten im Stadium T2 oder T3 überleben unbehandelt nur in 5-10% länger als 5 Jahre (Hautmann, 2010). Diese Tumore verhalten sich aggressiv und metastasieren früh. Die Metastasierung geschieht vorwiegend lymphogen über die Beckenlymphknoten nach paraaortokaval mit hämatogenen Fernmetastasen in Lunge, Leber und Skelett.

Insgesamt sind bei muskelfiltrierenden Harnblasenkarzinomen interindividuell sehr unterschiedliche Verläufe zu beobachten. Die bisherigen klinischen und pathologischen Parameter sind für eine zuverlässige Detektion von Patienten mit hohem Rezidiv- und Mortalitätsrisiko alleine nicht ausreichend (Bolenz & Lotan, 2008).

Eine denkbare Ergänzung, um das Rezidiv- und Progressionsverhalten besser abschätzen zu können, wäre der Einsatz von molekularen Markern (Kim & Bae, 2008).

Beispielsweise konnte ein Zusammenhang zwischen der Expression des Tumorsuppressors p53 und dem Proliferationsmarker MIB-1 und der rezidivfreien Zeit bzw. dem tumorabhängigen Überleben festgestellt werden (Popov et al., 1997).

Auch der immunhistochemische Nachweis des epidermal growth factor receptors (EGFR) hängt eng mit dem Rezidiv- und Progressionsverhalten des Harnblasenkarzinoms zusammen (Nguyen et al., 1994).

Eine routinemäßige Anwendung von molekularen Markern erfolgt bislang noch nicht (Mohammed et al., 2016).

In Hinblick auf individuelle Behandlungskonzepte und Nachsorgeintervalle können Molekularmarker helfen, Risikopatienten zu identifizieren (Lotan et al., 2013). Nur so ist es letztlich möglich, die Prognose des Harnblasenkarzinoms zu verbessern.

1.1.8 Diagnostik

Die Diagnostik hat zum einen das Ziel, das Vorliegen der Erkrankung zu sichern und zum anderen, den Patienten eine stadien- und prognoseorientierte Therapie zukommen lassen zu können.

Einleitung

In der Zystoskopie zeigt sich der Typ, die Anzahl und Ausdehnung der Tumoren. Gesichert wird die Diagnose durch die transurethrale Resektion der Blase (TUR). Die TUR stellt gleichzeitig die definitive Therapie für Ta, T1 und teilweise T2-Tumore dar. Der Tumor sollte komplett reseziert werden und zum Ausschluss von Präkanzerosen weitere Proben aus dem Uroepithel der Blase entnommen werden. Obligat ist die bimanuelle Palpation.

Die Detektionsrate, insbesondere von flachen und schwer sichtbaren Tumoren, kann durch Anwendung der sog. photodynamischen Diagnostik (PDD) verbessert werden. Bei der Blaulichtzytoskopie wird eine Stunde vor der eigentlichen Zystoskopie ein Photosensibilisator instilliert, beispielsweise 5-Aminolävulinsäure (5-ALA). Das Tumorgewebe leuchtet dann unter blauem Licht rötlich. Im Vergleich zur Weißlichtzytoskopie konnten über 50% mehr Carcinoma in situ detektiert werden (Zaak et al., 2002).

In der Urinzytologie werden abgeschilferte Zellen mikroskopisch beurteilt. Gewonnen werden die Zellen aus spontanen Urinproben oder aus Blasenspülproben. Die Sensitivität korreliert mit dem Differenzierungsgrad des Tumors und beträgt bei Grad-1-Tumoren 10-30% und bei Grad-3-Tumoren incl. CIS 80-90% (Hautmann, 2010).

Insbesondere die geringe Sensitivität bei gut differenzierten Urothelkarzinomen führte zur Suche nach Urinmarkern. Zellzyklusregulatoren, Proliferations- und Apoptosemarker, tyrosinkinase-assoziierte Marker, epigenetische Marker und Angiogenesefaktoren kommen hinsichtlich der Markersuche eine besondere Bedeutung zu (Mohammed et al., 2016).

Aktuell sind jedoch keine Biomarker empfohlen (Stenzl et al., 2012; Witjes et al., 2014). Neben den hohen Kosten ist auch der hohe Anteil an falsch positiven Ergebnissen von Nachteil (Todenhofer et al., 2013).

Die bildgebenden Verfahren spielen im Tumornachweis eine eher untergeordnete Rolle. Die Sonografie vermittelt einen orientierenden Blick auf Harnblase und Niere. Im Urogramm stellen sich eher Raumforderungen im oberen Harntrakt dar. Auch im Zystogramm stellen sich Harnblasenkarzinome nur gelegentlich dar. In der Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein Tumor identifizierbar und die

Einleitung

Tumorausbreitung bzw. Infiltration der Nachbarorgane lässt sich beurteilen. Lymphknotenmetastasen <1 cm werden allerdings genauso wenig erfasst wie Mikrometastasen. Die operative Lymphadenektomie bietet hier den einzig sicheren Nachweis oder Ausschluss.

1.1.9 Therapie

Die Behandlungsoptionen hängen in erster Linie vom TNM-Stadium und histologischen Differenzierungsgrad des Tumors und dem Allgemeinzustand des Patienten ab.

1.1.9.1 Therapie des nicht-muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms

Zum nicht muskelinvasiven Harnblasenkarzinom (NMIBC) zählen Ta, T1 und CIS, was bei Erstdiagnose auf 75% der Patienten zutrifft (Metts et al., 2000). Ziel der Behandlung ist der Erhalt einer funktionstüchtigen Blase und ein Langzeitüberleben ohne Tumor. Die Standardtherapie ist die transurethrale Resektion (TUR), bei der mit einer hochfrequenzstromführenden Schlinge der Tumor fraktioniert oder, wenn möglich, in toto abgetragen wird. Bei inkompletter Resektion, höhergradigen Tumoren oder T1-Tumoren wird eine zweite TUR nach 2-6 Wochen empfohlen (J. Alfred Witjes, 2016). Die Zufallsbiopsie aus anderen Blasenregionen kann eventuelle Präkanzerosen bzw. begleitende Dysplasien detektieren.

Die Chemotherapie ist als systemische Therapie oder als lokale Instillationstherapie möglich und abhängig vom individuellen Risiko (J. Alfred Witjes, 2016). Zur Instillationstherapie wird in erster Linie Mitomycin C verwendet bzw. das Immuntherapeutikum BCG (Bacillus Calmette-Guérin), wobei es sich um abgeschwächte Tuberkelbakterien handelt (Weiss, Pietzak, Wein, Malkowicz, & Guzzo, 2015). In der systemischen Therapie kommt als Standard Erstlinien-Therapie das GC-Schema (Gemcitabin und Cisplatin) oder M-VAC-Schema (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin) zum Einsatz, alternativ carboplatinhaltige Schemata (Stenzl et al., 2012).

1.1.9.2 Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms

Beim muskelinvasiven Blasenkarzinom ist bei Frauen und Männern die radikale Zystektomie die Therapie der Wahl (J. Alfred Witjes, 2016). Dabei werden neben der kompletten Harnblase die distalen Ureteren entfernt. Beim Mann werden eventuell zusätzlich Prostata und Samenblasen, bei der Frau die angrenzende Vaginalwand, Ovarien und der Uterus entfernt (Stein & Skinner, 2004). Die Lymphadenektomie hat zum einen kurativen Charakter, zum anderen kommt ihr die wichtige Bedeutung der Prognoseeinschätzung zu. Gegebenenfalls schließt sich an eine Zystektomie die Versorgung mit einem orthotopen Blasenersatz an. Nach radikaler Zystektomie bei T2-Tumoren ohne neoadjuvante Therapie beträgt die fünf-Jahres-Überlebensrate 62% (Madersbacher et al., 2003). Auch in der palliativen Situation können Patienten von einer Zystektomie durch eine gute lokale Tumor- und damit Symptomkontrolle profitieren (Madersbacher et al., 2003)

Lange Zeit galt das metastasierte Harnblasenkarzinom als inkurabel. Unbehandelt liegt das mittlere Gesamtüberleben bei 3-6 Monaten (Bellmunt et al., 2013). Auch hier kommen, je nach Allgemeinzustand und Komorbiditäten des Patienten, das oben genannte GC- bzw. M-VAC-Schema zum Einsatz (J. Alfred Witjes, 2016). Beide Schemata bewirken ähnliche Gesamtüberlebensraten, allerdings ist das GC-Schema besser verträglich (von der Maase et al., 2000). Trotz der hohen Toxizität der Therapieregime ist der Erfolg, insbesondere in der Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms, oft unbefriedigend. Das mittlere progressionsfreie Überleben mit dem GC-Schema liegt bei durchschnittlich nur 7,7 Monaten, das mediane Überleben beträgt 14 Monate (Roberts et al., 2006).

Mit dem zunehmenden Wissen um die Pathophysiologie der Tumore entstanden auch neue Angriffspunkte für zielgerichtete Therapieschemata. Beispielsweise hängt der epidermal growth factor receptor (EGFR) eng mit dem Rezidiv- und Progressionsverhalten des Harnblasenkarzinoms zusammen (Nguyen et al., 1994). Erlotinib ist ein EGFR-Inhibitor. Bei Patienten mit

Einleitung

muskelinvasivem Harnblasenkarzinom konnte mit einer neoadjuvanten Erlotinib-Gabe eine Verkleinerung des Tumors erreicht werden (Pruthi et al., 2010).

Bereits in mehreren klinischen Studien erfolgreich eingesetzt wurde der monoklonale IgG1- Antikörper Atezolizumab (Rosenberg et al., 2016). Er bindet direkt an den programmierten Zelltod-Liganden PD-L1, über den die Hemmung der Immunantwort aufgehoben und die antitumorale Immunantwort aktiviert wird (Powles et al., 2014). Zum Einsatz kommt Atezolizumab beim lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Harnblasenkarzinom nach erfolgter platinhaltiger Chemotherapie (Rosenberg et al., 2016). Etwa 30-50% der Patienten erfüllen die Kriterien für den Erhalt von Cisplatin nicht, beispielsweise wegen ihrer schlechten Nierenfunktion (Dash et al., 2006). Atezolizumab scheint auch für diese Patientengruppe ein recht gut verträglicher und wirksamer Wirkstoff zu sein (Balar et al., 2017).

Die weitere Entwicklung solcher neuer Therapieansätze birgt ein enormes Potential in der Behandlung des fortgeschrittenen Harnblasenkarzinoms.

1.2 Somatostatin und seine Rezeptoren

1.2.1 Somatostatin

Vor über vierzig Jahren wurde Somatostatin (SST) als ein Inhibitor des hypophysären Wachstumshormons (GH), auch bekannt als Somatotropin, entdeckt (Brazeau et al., 1973). Es handelt sich um ein natürlich vorkommendes zyklisches Peptidhormon mit zahlreichen Funktionen. Es gibt zwei biologische SST- Isoformen: SST-14 und SST-28, letzteres mit einer Verlängerung am N-Terminus. SST-14 und SST-28 haben beide eine hohe Bindungsaffinität zu allen fünf SST-Rezeptorsubtypen.

SST spielt eine große Rolle in der Regulation und insbesondere Hemmung von unterschiedlichsten physiologischen Funktionen im menschlichen Körper (Theodoropoulou & Stalla, 2013). Es kann unterschieden werden zwischen antisekretorischen und -proliferativen Effekten des SST.

Der antisekretorische Effekt des SST zeigt sich neben der Hemmung der GH-Freisetzung über SSTR2 und SSTR5 außerdem in der Inhibition des Thyreoidea-stimulierenden Hormons (TSH), Prolaktin und gastrointestinaler Hormone wie Gastrin (Koch & Schonbrunn, 1988; Ren et al., 2003). SST hemmt die Magensäuresekretion und Freisetzung von Pankreasenzymen (Bloom et al., 1974). Außerdem moduliert es die Magenentleerung und den intestinalen Blutfluss (Pawlik, Gustaw, Czarnobilski, Sendur, & Konturek, 1989). Es konnte gezeigt werden, dass SST über SSTR2 bzw. SSTR3 die GH-induzierte IGF-1-Produktion in der Leber und damit die Glukagon- und Insulinfreisetzung hemmt (Besser et al., 1974; Murray et al., 2004). Ferner nimmt es, zumeist hemmenden, Einfluss auf das Immunsystem (van Hagen et al., 1994). Auch auf Funktionen des Zentralnervensystems wie die Langzeitpotenzierung (LTP) nimmt SST Einfluss (Fan & Fu, 2014).

Neben seiner Wirkung auf die endokrine und exokrine Sekretion spielt SST auch eine Rolle in der Zellproliferation, im Zellüberleben und der Angiogenese von normalen Zellen und Tumorzellen.

Beim Wechsel von ruhendem zu proliferierendem Epithel scheint eine Hochregulierung von SSTR2 und SSTR5 stattzufinden, sog. „angiogenic switch“

(Adams, Adams, Lindow, Zhong, & Atkin, 2005; Woltering, 2003). Bocci et al. (2007) konnten hingegen nachweisen, dass SST über den SSTR1 eine eher antiangiogenetische Wirkung hat.

Bereits vor über 20 Jahren konnte nachgewiesen werden, dass nach SST-Analoga-Gabe die Aktivität der Thyrosin-Phosphatase (PTP) steigt und wachstumsfaktortragende Tyrosinkinaserzeptoren dephosphoryliert und damit inaktiviert werden. SSTR1, 2, 4 und 5 vermitteln auf diese Weise einen Zellzyklusarrest am G1/S-Übergang oder über den SSTR3 am G2/M-Übergang (Cheung & Boyages, 1995; Sharma, Patel, & Srikant, 1996; Srikant, 1995). Auch über die Hemmung von L-Typ-Ca²⁺ Kanälen, vermittelt von SSTR2 und SSTR5, wirken SST bzw. seine Analoga direkt zytostatisch an Tumorzellen (Tallent et al., 1996).

Die Apoptoseresistenz ist eine weitere zentrale Eigenschaft von malignen Tumoren. Unter Apoptose versteht man den gezielten und kontrollierten Untergang einer Zelle, was auf verschiedenen Wegen erfolgen kann. SST bzw. seine Analoga induzieren beispielsweise eine Azidifizierung der Zelle, was zur Apoptose führt (Srikant, 1995; Thangaraju et al., 1999). Auch die Hemmung des Na⁺/H⁺ Austauschers (NHE1) führt zu einer Übersäuerung der Zelle. Gehemmt werden kann NHE1 von SSTR1, 3 und 4 (C. Y. Lin et al., 2003). SSTR2 und SSTR3 können außerdem die Apoptose induzieren, abhängig oder nicht von einer Akkumulation des Tumorsuppressors p53 (Sharma et al., 1996; Teixeira et al., 2002).

SST spielt offensichtlich eine sehr große Rolle in der Regulation von unterschiedlichen physiologischen Funktionen im menschlichen Körper. Die in den letzten Jahren in verschiedenen Bereichen der Tumorbekämpfung angestellten Forschungen zeigen das enorme Potential von SST und seiner Analoga.

1.2.2 Somatostatin-Analoga und Konjugate

Natürlich vorkommendes SST hat eine systemische Halbwertszeit von einer bis drei Minuten. Deswegen wurden synthetische, stabilere, Derivate entwickelt. Es

Einleitung

gibt Peptid- und Nicht-Peptid-Analoga, die affin sind zu einem einzelnen Rezeptor-Subtyp, mehreren oder Pan-Somatostatin-Analoga.

Octreotid und Lanreotid sind Beispiele für SST-Analoga (SSTA) und werden unter anderem bereits in der Behandlung der Akromegalie bzw. Gastroenteropankreatischen Neuroendokrinen Tumoren (GEP-NET) eingesetzt (Faiss et al., 1999; Reubi, Laissue, Krenning, & Lamberts, 1992).

Auch beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom wäre unter Umständen eine Therapie mit SST-Konjugaten beispielsweise als neoadjuvante oder adjuvante Therapie denkbar.

Zu den für die Tumorentwicklung wichtigen Angiogenesefaktoren gehören unter anderem der vascular endothelial growth factor (VEGF) (Guillermet-Guibert et al., 2005). Bei Patienten mit Kolorektalem Karzinom wurden durch die Behandlung mit dem SSTA Octreotid die VEGF-Expression des Tumors und der VEGF-Serumlevel gesenkt (Cascinu et al., 2001). Auch eine SSTR3-vermittelte Herunterregulation der VEGF-Transkription konnte gezeigt werden (Florio et al., 2003). Außerdem hemmen SSTA die Angiogenese in der Chorion-Allantois-Membran des Huhnes (CAM-Model), in Epithelzellen der menschlichen Umbilicalvene (HUVEC) und der menschlichen Plazentavene (HPVAM-Model) (Woltering, 2003). Bei GEP-NET wird unter SSTA-Hochdosis-Therapie mit Lanreotid von antiproliferativen Effekten, Besserung der Symptome und in einzelnen Fällen gar von einer Regression berichtet (Faiss et al., 1999).

Eine andere Möglichkeit, sich das SST in der anti-Krebs-Therapie oder Diagnostik zu Nutze zu machen ist die Verknüpfung mit einem Chemotherapeutikum oder radioaktiven Liganden. Die rezeptorgerichtete Überbringung der Chemotherapeutika bietet verschiedene Vorteile. Werden durch die Analoga die jeweiligen tumorspezifischen und überexprimierten SSTR selektiv anvisiert, treten bei gesteigerter Effizienz weniger systemische Nebenwirkungen auf. In den letzten Jahren wurden verschiedene Analoga mit verschiedenen Chemotherapeutika kombiniert. Beispiele für solche Konjugate sind Verbindungen von SST mit Paclitaxel, Methotrexat, Doxorubicin, Combrestatin und Colchizin (Sun & Coy, 2011; Szereday et al., 2003).

Die in den letzten Jahren geschaffene Evidenz der antineoplastischen Wirkung von zytotoxischen SSTA in verschiedenen Tumoren in vivo und in vitro lassen auf weitere Erfolge hoffen. Umso wichtiger ist es, die Verteilung und die Stärke der Expression von SSTR nun auch am Harnblasenkarzinomgewebe zu erfassen. Nur so kann die potentielle Rolle von Somatostatin-Rezeptoren und ihre Bedeutung für die Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms evaluiert werden.

1.2.3 Somatostatinrezeptoren

Seine Wirkung entfaltet SST über die Bindung an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) mit sieben Transmembrandomänen (Guillermé-Guibert et al., 2005). Mithilfe Rezeptor-spezifischer Analoga und der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern wurde die Identifikation der einzelnen Somatostatinrezeptor (SSTR) - Subtypen möglich

Die SST-Rezeptorfamilie besteht aus fünf Somatostatin-Rezeptoren (SSTR1-SSTR5). Der SSTR2 kommt außerdem in den Spleißvarianten SSTR2A und SSTR2B vor (Patel, Greenwood, Kent, Panetta, & Srikant, 1993). Bisher wurde jedoch nur die 2A-Variante in menschlichem Gewebe gefunden (Fischer et al., 2008).

SSTR werden auf fünf verschiedenen Chromosomen kodiert (Hoyer, 2000). Für die Erkennung und Bindung der Liganden ist das extrazelluläre N-terminale Segment zuständig, während die Weiterleitung des Signals ins Zellinnere durch den intrazellulär gelegenen C-Terminus erfolgt (Patel, 1999). Die Wirkung von SST auf eine Zelle kommt durch ein komplexes Zusammenspiel jeweils mehrerer Rezeptortypen zustande (Moller, Stidsen, Hartmann, & Holst, 2003). Dabei erfolgt die Signalweiterleitung bei allen sechs SSTR-Subtypen über die Hemmung der Adenylatcyclase. SSTR1 und 2 sind zusätzlich assoziiert mit spannungsabhängigen Ca²⁺ Kanälen, SSTR1 mit Na⁺/H⁺ Austauschern und SSTR2 bis 5 zusätzlich mit regulierenden K⁺ Kanälen (Taniyama et al., 2005). SSTR werden in variabler Dichte in Normal- und in Tumorgewebe exprimiert (Reubi, Waser, Schaer, & Laissue, 2001). Außer ihrer oben beschriebenen Wirkung auf die endokrine und exokrine Sekretion vermitteln SSTR eine

Einleitung

hemmende Rolle in der Zellproliferation, im Zellüberleben und der Angiogenese von physiologischen Zellen und Tumorzellen, was essentiell für die Entwicklung, Invasion und Metastasierung eines Tumors ist.

In Gehirn, Hypophyse, Gastrointestinaltrakt, Pankreas, Schilddrüse, Nieren und zahlreichen anderen Geweben konnten verschiedene SSTR-Subtypen bereits identifiziert werden (Reubi et al., 1992; Taniyama et al., 2005). Die immunhistochemische Evaluation der SSTR-Expression des Harnblasenkarzinoms steht allerdings noch aus.

Eine Auswertung der Expression der einzelnen SSTR-Subtypen im Gewebe des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms könnte helfen, die Karzinogenese zu verstehen, die Progression der Tumore besser abzuschätzen, die Diagnose einfacher zu stellen und neue Therapieansätze liefern.

1.2.3.1. Nachweis

Für den morphologischen Nachweis von SSTR im Gewebe gibt es verschiedene Methoden.

Die *In-Situ-Hybridisierung* stellt nicht das eigentliche Protein dar, sondern die mRNA.

Mit der *Autoradiographie* ist die Rezeptorbindungsstelle beurteilbar. Neben ihrer hohen Spezifität und Sensitivität überzeugt diese Methode aufgrund ihrer geringen Auflösung jedoch nicht.

Mit der *Immunhistochemie* steht eine Methode zur Verfügung, die mittels spezifischer Antikörper membranständige Rezeptoren in fixiertem Gewebe erkennt. Sie überzeugt durch ihre hohe Auflösung. Neben dem Vorkommen ist es auch möglich, die Lokalisation und Quantität der Proteine zu bestimmen (Taylor & Levenson, 2006). Durch selektive Antikörper ist es möglich, die einzelnen SSTR-Subtypen zu identifizieren. Beispielsweise ist es in der Routinediagnostik möglich, die SSTR2A-Expression in menschlichen neuroendokrinen Tumoren mittels des Kaninchen-Antikörpers UMB-1 zu evaluieren (Fischer et al., 2008).

1.3 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Es konnte bereits gezeigt werden, dass SSTR im Harnblasenkarzinomgewebe und normalem Blasengewebe exprimiert werden (Karavitakis, Msaouel, Michalopoulos, & Koutsilieris, 2014). Die hier vorliegende immunhistochemische Untersuchung der SSTR-Expression an einem großen Patientenkollektiv mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom ist die erste ihrer Art.

Ziel der Arbeit war der Nachweis und die semiquantitative Bestimmung der SSTR1-5-Expression in muskelinfiltrierenden Harnblasenkarzinomen und in korrespondierenden normalen Urothelien.

Folgende Fragestellungen sollen in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden: Welche SSTR-Subtypen werden exprimiert und in welchen subzellulären Segmenten? Gibt es Intensitätsunterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe? Lassen sich Muster von Co-Expressionen der SSTR-Subtypen erkennen?

Anschließend wurde untersucht, ob sich klinische Implikationen für die Diagnostik ableiten lassen. Folgende Fragestellungen wurden dabei bearbeitet: Gibt es einen Zusammenhang der SSTR-Expression mit dem TNM-Stadium und Grading? Lassen sich Aussagen zur SSTR-Expression in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht machen?

Und zuletzt wurde die potentielle prognostische Wertigkeit eruiert: Gibt es einen Zusammenhang zwischen der SSTR-Expression mit der rezidivfreien Zeit, dem tumorspezifischen Überleben und dem Gesamtüberleben?

Es besteht in mehrfacher Hinsicht ein Interesse daran, Tumoren in einem frühen Stadium zu entdecken, seine Entwicklung abzuschätzen, Rezidive schnell zu erkennen und neue Ansätze für die Therapie zu finden. Die vorliegende Arbeit soll ihren Teil zum Verständnis über die Pathologie und Tumorbilogie beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Diese Untersuchung umfasste 103 Patienten, die sich im Zeitraum von 1996 bis 2006 einer Zystektomie in der Urologischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen unterzogen. Zum Zeitpunkt der Zystektomie hatte jeder der eingeschlossenen Patienten ein urotheliales Harnblasenkarzinom \geq pT2a.

Zuerst wurde eine 299 Patienten umfassende Gesamtdatenbank erstellt, die sich in der Urologischen Klinik Tübingen im Zeitraum von Dezember 1984 bis Dezember 2006 einer Zystektomie unterzogen. Grundlage waren bereits bestehende Datenbanken. Ergänzt wurde die zusammengetragene Gesamtdatenbank durch weitere Parameter mit dem Ziel einer optimalen onkologischen Charakterisierung des Patientenkollektivs zum Zeitpunkt der Zystektomie. Die Gesamtdatenbank umfasste schließlich Name, Vorname, Geburtsdatum, Geschlecht, Operationsmethode, Datum der OP, Alter zum Zeitpunkt der Operation, TNM-Stadien, R-Status, Grading und CIS. Außerdem umfasst die Datenbank Informationen zur Therapie: vorherige Instillationstherapie, neoadjuvante und adjuvante Chemotherapien. Weiterhin umfasst sie Informationen über das Follow-up wie Vorliegen eines Rezidivs, Datum des Rezidivs, errechnete Zeitspanne bis zum Auftreten des Rezidivs, tumorabhängiges Versterben, Zeitpunkt des tumorabhängigen Versterbens, errechnete Zeitspanne bis zum tumorabhängigen Versterben, errechnetes Gesamtüberleben beziehungsweise letzte Beobachtung der Patienten. Zuletzt sind persönliche Daten wie Anschrift und Telefonnummer und die behandelnde niedergelassene urologische Praxis und ggf. Hausarztpraxis festgehalten.

Grundlage zur Erstellung der Datenbank waren Pathologieberichte, Arztbriefe, radiologische Konsile und Daten des CCC (Comprehensive Cancer Center). Ergänzende Informationen wurden durch Faxe und Telefonate mit Patienten, Urologen und Hausärzten erhoben. Die letzte Erhebung des Patientenkollektivs erfolgte am 02.08.2013.

Aus dem Kollektiv ausgeschlossen wurden anschließend Patienten, die unter die unter Punkt 2.1.1 aufgeführten Kriterien fielen. Auf diese Weise mussten 196 Patienten vom Kollektiv ausgeschlossen werden.

Von den verbleibenden 103 Patienten musste bei 9 Patienten auf die Daten einer TUR-B zurückgegriffen werden. Bei diesen Patienten wurde zum Zeitpunkt der Zystektomie kein muskelinfiltrierendes Harnblasenkarzinom mehr nachgewiesen.

2.1.1 Ausschlusskriterien

- Zeitpunkt der Zystektomie vor Januar 1996 aufgrund fehlender Verfügbarkeit der Paraffinblöcke
- fehlende Auffindbarkeit von Paraffinblöcken
- unvollständige Pathologieberichte
- andere Blasentumor-Entitäten als urotheliale Tumore (wie Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome u.a.)
- Patienten mit Zystektomiepräparaten ohne muskelinfiltrierendes Harnblasenkarzinom und ohne urotheliale Karzinomanteile
- Auftreten von Tumoren anderer Genese mit Harnblaseninfiltration
- Normalgewebe mit Expression von p53 und CK20- dies deutet auf lediglich entzündliche, reaktive, Veränderung hin (Mallofre, Castillo, Morente, & Sole, 2003)

2.2 Tissue Microarrays

Das Verfahren der Tissue Microarrays (TMA) ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung einer großen Anzahl von Geweben. J. Kononen postulierte dieses Verfahren erstmalig im Jahre 1998 (Kononen et al., 1998). Dafür werden verschiedenen Tumorgeweben aus einem Spenderblock („Donor“) Stenzen entnommen und die Gewebezylinder auf einem Paraffinblock („Recipient“) zusammengesetzt. In Verbindung mit der Immunhistologie ist es so möglich, mittels einer einmaligen Applikation eines Antikörpers viele Stanzzyylinder gleichzeitig standardisiert zu untersuchen. Der Vorteil ist, dass gleiche

Material und Methoden

Färbebedingungen und Umgebungseigenschaften herrschen, was eine genaue Vergleichbarkeit der einzelnen Stanzungen ermöglicht. Außerdem werden bei einem TMA weniger Materialien verbraucht, er ist damit kostengünstig und ressourcenschonend. Das Verfahren des TMA spielt deswegen vor allem auch in der Tumorforschung eine große Rolle.

Die Effizienz, Ökonomie und Genauigkeit dieser Technologie wurden in den letzten Jahren immer wieder bestätigt (Braunschweig, Chung, & Hewitt, 2004; Kumar, De Silva, Venter, & Armes, 2004).

Neben dem TMA sind zahlreiche andere Charakterisierungen von Tumorproben möglich, beispielsweise mittels in situ Hybridisierung der DNA oder RNA oder der Nachweis von RNA bzw. DNA mittels PCR.

Die Auswahl und Erstellung der in der hier vorliegenden Studie verwendeten TMA-Blöcke stellte sich im Detail wie folgt dar:

Verwendet wurden Paraffinblöcke des Paraffinarchivs des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen. Pro Patient wurden je zwei Blöcke mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinomgewebe sowie ein Block mit Normalgewebe herausgesucht. War dies, beispielsweise nach einer radikalen Zystektomie ohne Resttumorgewebe nicht möglich, wurde das Material der vorausgegangenen TUR-B verwendet. Die Auswahl der Blöcke erfolgte anhand der jeweiligen Pathologieberichte über das Paraffinarchiv des Institutes für Pathologie der Universität Tübingen.

Die zum jeweiligen Paraffinblock passenden HE- Schnittpräparate wurden herausgesucht und repräsentative Tumoranteile und Normalgewebe markiert. Das jeweils markierte HE-Schnittpräparat wurde über den Geberblock gelegt und mit einer Hohlzahn nadel das gewünschte Areal anvisiert. Die für diese Untersuchung verwendete Hohlzahn nadel hatte einen Durchmesser von 0,6mm für die Arrays 1 und 2 bzw. 1mm für die Arrays 3 und 4. Auf diese Weise wurden repräsentative Gewebestücken (insgesamt 363) aus verschiedenen Lokalisationen entnommen und auf vier neuen Paraffinblöcken, den Empfängerblöcken, angebracht. Zuvor wurde dort an der gewünschten Stelle ein Loch gestanzt. Der Abstand zwischen

den einzelnen Stenzen betrug 1 mm. Es wurde für die bessere Orientierung unter dem Mikroskop darauf geachtet, dass die Anordnung der Stanzzyylinder auf den Empfängerblöcken in einer Reihe erfolgte. Für eine später eindeutige Zuordnung der vier Arrays wurde auf die Anordnung als asymmetrisches Muster geachtet. Zusätzlich wurden zur besseren Orientierung Stenzen mit Schweinemuskulatur eingebracht (siehe Abb.3). Verwendet wurde der Manual Tissue Arrayer MTA I der Firma BeecherInstruments, Inc. (Sun Prairie, WI, USA).

Die fertigen TMA-Blöcke wurden anschließend im Wärmeschrank auf 37°C erwärmt. Auf diese Art wurde sichergestellt, dass sich das Paraffin besser mit den verschiedenen Gewebestücken verbindet, um ein Auseinanderbrechen beim anschließenden Schneiden zu verhindern.

Die Schnitte für das Mikroskopiepräparat wurden in einer Dicke von 4-6µm geschnitten. Das verwendete Mikrotom war das Mikrotom RM 2125RT (Leica, Nussloch, Germany). Zuletzt wurden die erhaltenen Schnitte auf Objektträgern fixiert.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Methode

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Methode, um Proteine oder andere Antigene (AG) mit Hilfe von markierten Antikörpern (AK) sichtbar zu machen. Bereits 1941 entwickelte Coons ein Verfahren, um Pneumokokken-AG mit AK nachzuweisen und verband damit die klassische Histologie mit der Biochemie. (Coons, 1941; Longuespee et al., 2014). In den folgenden Jahren wurde dieses Verfahren immer weiter entwickelt.

Man unterscheidet verschiedene Färbungen: Bindet ein Primärantikörper über ein Epitop an spezifische Gewebeeigenschaften mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion und sind die Primärantikörper mit einem Detektionssystem (Marker) verbunden, spricht man von einer direkten Färbung. Ein solches Detektionssystem kann z.B. Fluoreszin sein, dann spricht man von der Immunfluoreszenz. Eine andere Möglichkeit ist, den Primärantikörper mit einem Enzym zu verknüpfen. Der Primärantikörper geht auch hier eine feste Antigen-Antikörper-Bindung ein. Gibt man dem Enzym ein spezifisches Substrat hinzu,

kommt es unter der Enzym-Substrat-Reaktion zur Bildung eines Farbstoffes, der dann sichtbar wird.

Bei der indirekten Färbung wird ein Sekundärantikörper eingesetzt. Dieser sekundäre AK ist gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet. In diesem Falle ist das Enzym mit dem Sekundärantikörper verbunden. Auch hier läuft die oben beschriebene Enzym-Substrat-Reaktion unter Bildung eines Farbstoffs ab, der sichtbar wird und als Indikator für ein bestimmtes Epitop gesehen werden kann.

Dank der Immunhistochemie ist es möglich, neben dem Vorkommen auch die Lokalisation eines Proteins zu bestimmen. So wird bei zytoplasmatischen Proteinen das Zytoplasma angefärbt. Sind Proteine beispielsweise membranständig oder nur im Zellkern lokalisiert werden entsprechend Zellmembran bzw. Zellkern angefärbt.

Als weiteres Merkmal zur Charakterisierung von Tumorgewebe dient die Quantifizierung der Antigenmenge. Dafür kann die optische Dichte und Färbeintensität hinzugezogen werden (Matkowskyj, Cox, Jensen, & Benya, 2003; Taylor & Levenson, 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich mit der Immunhistochemie Tumorgewebe hinsichtlich Vorkommen, Verteilung und Quantität ihrer spezifischen Antigene charakterisieren lassen.

2.3.2 Labelled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode

Die Labelled (Strept-) Avidin- Biotin- Methode (LSAB) - Methode zählt ebenfalls zu den indirekten Nachweismethoden. Seit ihrer Etablierung 1981 wird die Avidin- Biotin- Immunhistochemie sehr häufig eingesetzt (Hsu, Raine, & Fanger, 1981).

Mit der LSAB- Methode wurden in dieser Untersuchung die SSTR-Subtypen nachgewiesen.

Material und Methoden

Der Sekundärantikörper ist hierbei biotinyliert und wird von peroxidasekonjugierten Streptavidin-Molekülen erkannt, die jeweils zu mehreren an den Sekundärantikörper binden (Guesdon, Ternynck, & Avrameas, 1979) (siehe Abb. 2A). Streptavidin, isoliert aus *Streptomyces avidinii*, hat vier Bindungsstellen für das Vitamin Biotin. Die mit dem Streptavidin-Molekül konjugierte Peroxidase, hochgereinigte Meerrettichperoxidase, kann daraufhin mit einem Chromogen (DAB+, 3,3'Diaminobenzidin) reagieren und eine kontrastreiche braune Färbung am Ort des vom primären Antikörper erkannten und gebundenen Antigens erwirken (siehe Abb. 2B).

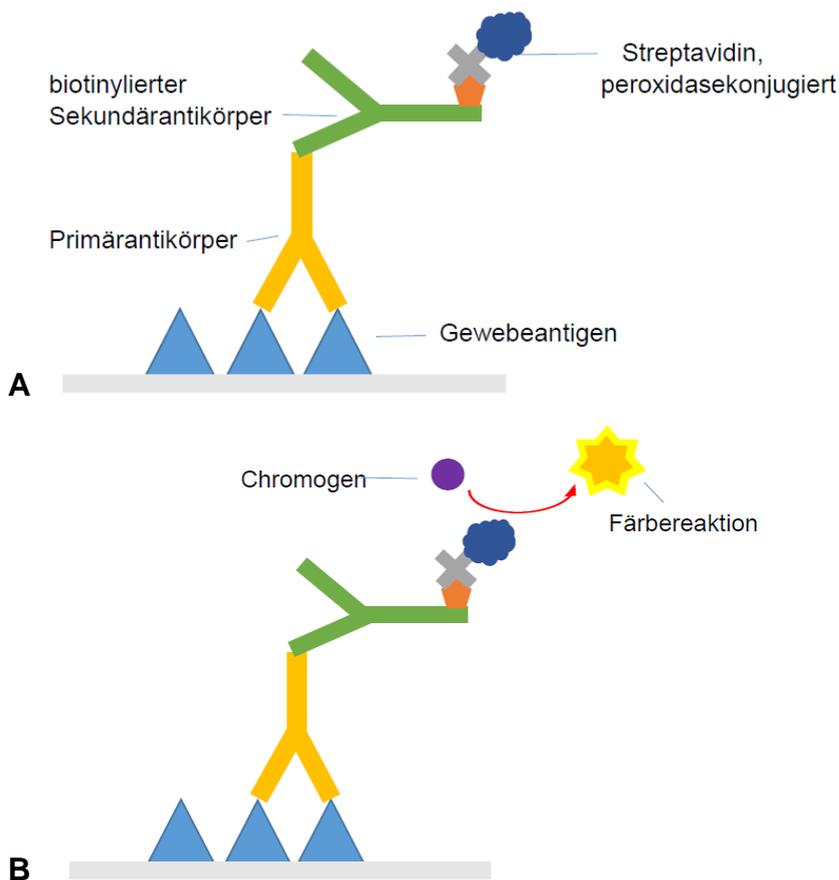


Abb. 2: LSAB-Methode, vereinfachte Darstellung. **(A)** Streptavidin-Biotin-Komplex. Der Primärantikörper bindet an das Antigen, **(B)** Reaktion der Peroxidase mit dem Chromogen und Sichtbarmachen der Bindung. (Eigene Darstellung, modifiziert nach Education Guide, Immunohistochemical Staining Methods, 5th Edition, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark).

Diese Reaktion kann allerdings auch durch die endogene Peroxidase katalysiert werden. Es ist möglich, dass die Aktivität der endogenen Peroxidase, die im Harnblasengewebe zahlreich vorhanden ist, durch den Vorgang der Gewebefixation nicht vollständig zerstört wurde. Deswegen sind falsch positive Ergebnisse und Hintergrundfärbungen zu befürchten. Durch die 30minütige Inkubation in 3%igem Wasserstoffperoxid wird die endogene Peroxidase geblockt und steht somit für die DAB-Oxidation nicht mehr zur Verfügung.

Insbesondere in formalinfixiertem Gewebe kann es außerdem zur sog. Maskierung des Antigens kommen. Ursache sind Aldehydvernetzungen, die die Bindung des Primärantikörpers an das Antigen verhindern oder erschweren und somit ein falsch negatives Ergebnis verursachen. Eine Möglichkeit zur Demaskierung ist das Kochen in Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle. Die Crosslinks lösen sich und der Primärantikörper kann optimal an das Antigen binden.

Bei einigen Geweben kommt es vor, dass sich Biotin oder Avidin auch ohne biotinylierten Antikörper binden, sei es an endogenes Biotin oder an unspezifische Gewebsbestandteile. Um dies zu verhindern ist vor der Antikörperzugabe eine Behandlung mit einem Avidin/Biotin Blocking-Kit sinnvoll. Mit diesen Hilfsmitteln und Vorgehensweisen kann eine unspezifische Hintergrundfärbung reduziert werden.

2.3.3 Durchführung der Immunhistochemie

In der vorliegenden Untersuchung werden fünf verschiedene immunhistochemische Färbungen verwendet: SSTR1, SSTR2, SSTR3, SSTR4 und SSTR5. Die Färbungen erfolgten im Kliniklabor der Klinik für Urologie der Universitätsklinik Tübingen. Vor Beginn der Immunfärbung wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht.

2.3.3.1 Färbeprotokoll gegen SSTR1, SSTR2, SSTR3 und SSTR4

Es wurde das im Folgenden aufgeführte Protokoll zur immunhistochemischen Färbung der SSTR-Subtypen 1, 2, 3 und 4 angewandt.

Material und Methoden

Die Schnittpräparate wurden zuerst über Nacht getrocknet bei 37°C im Wärmeschrank. Dann wurden sie in einem ersten Schritt 3x 10min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96%, 70%) rehydriert. Vor der Färbung mit dem Antikörper wurde die Aktivität der endogenen Peroxidase reduziert durch 30-minütige Inkubation mit 3%igem Wasserstoffperoxid (Fa. Sigma) und anschließend mit TBST (0,1 M Tris, pH 7,6, 0,15 M NaCl) gespült.

Jeder der SSTR-Subtypen benötigt eine individuelle Vorbehandlung und Verdünnung (siehe Tab. 3). Diese ist im Folgenden aufgeführt:

SSTR-Subtyp	Verdünnung	Demaskierung
SSTR1	3µg/ml	Kochen in 10mM Citratpuffer (pH 6,0) 15min in der Mikrowelle
SSTR2	1:100	Kochen in Dako high pH-Puffer 10min in der Mikrowelle
SSTR3	8µg/ml	Kochen in Dako high Puffer (pH 9,0) 15min in der Mikrowelle
SSTR4	4µg/ml	Kochen in 10mM Citratpuffer (pH 6,0) 20min in der Mikrowelle

Tab. 3: Verdünnung und Demaskierung für SSTR1-4.

Die Demaskierung erfolgte für die einzelnen SSTR-Subtypen gemäß dem Vorbehandlungsschema. Nach der Abkühlung für 30min im jeweiligen Puffer folgte abermals eine Waschung mit TBST.

Als Blocklösung diente das Avidin/Biotin Blocking Kit (Vector Blocking-Kit SP-2001). Die Inkubationszeit in der Avidin Solution betrug 15min, nach zweimaliger Waschung für jeweils 5min mit TBST erfolgte die fünfzehnminütige Inkubation in der Biotin Solution. Auch hierauf folgte 2x 5min waschen mit TBST.

Material und Methoden

Die Schnittpräparate wurden mit den Primärantikörpern über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.

Verwendet wurden hierzu die Primärantikörper Anti-SSTR1-mIgG1 gegen SSTR1, Anti-SSTR2 (UMB1) gegen SSTR2, Anti-SSTR3-mIgG2a gegen SSTR3 und Anti-SSTR4-mIgG2a gegen SSTR4 der Firma Novartis (Novartis AG, Basel, Schweiz).

Dabei wurde für jeden Subtyp eine eigene Verdünnung gewählt (siehe Tab. 3). Als Verdünnungsmedium diente bei allen vier Subtypen der Dako Real™ Antibody Diluent (Dako, Glostrup, Denmark).

Am nächsten Tag wurden die Schnittpräparate 3x 5min mit TBST gespült.

Die weiteren Schritte erfolgten mit dem Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Dako, Glostrup, Denmark), beruhend auf einem indirekten Streptavidin-Biotin –Verfahren, der sog. LSAB-Methode.

Als biotinylierter Sekundärantikörper dienten Dako REAL™ Biotinylated Secondary Antibodies (AB2), biotinylierte Ziege-Anti-Maus- und Ziege-Anti-Kaninchen-Immunglobuline. Die Inkubationszeit betrug 30min bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Waschung mit TBST 3x 5min.

In einem letzten Inkubationsschritt wurde das Farbsubstrat hinzugegeben, bestehend aus 20µl DAB+ Chromogen (DAB-Lösung, Diaminobenzidinlösung) und 1000µl wasserstoffperoxidhaltigem HRP Substrate Buffer. Die Inkubationszeit betrug 2min für SSTR1, 3min für SSTR2, 6min für SSTR3 und 5min für SSTR4, die anschließende Waschung wurde 2x 5min mit Aqua dest. durchgeführt.

Als Gegenfärbung wurde eine 60-sekündige Hämatoxilin-färbung nach Meyer (Romeis, 2010) mit anschließendem Bläuen für 7min unter Leitungswasser angeschlossen.

Die Dehydrierung erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (96%, 100%) für 2x 3min bzw. 2x 5min und abschließend 3x 5min mit Xylol.

Die nun fertig gefärbten Schnittpräparate wurden abschließend eingedeckt mit Hilfe des VectaMount (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA).

2.3.3.2 Färbeprotokoll gegen SSTR5

Die Entparaffinierung in Xylol, die Rehydrierung mit einer absteigenden Alkoholreihe und der Peroxidaseblock mit 3%igem Wasserstoffperoxid erfolgten analog der Färbung mittels Anti-SSTR1-4. Die Waschung erfolgte ebenfalls mit TBST für 5min.

Für die Demaskierung wurde auch hier das Kochen für 3x 5min in Citratpuffer in der Mikrowelle (Moulinex Mikro-Chef MO 500, Moulinex, Alençon, Frankreich) gewählt. Anschließend kühlten die Präparate für 30min bei Raumtemperatur ab und wurden 2x 5min mit TBST (0,05M Triss pH7,6; 1,15M NaCl; 0,1% Tween 20) gewaschen.

Als Primärantikörper wurden SSTR5 von Novartis (Novartis AG, Basel, Schweiz) benutzt in einer Verdünnung von 3µg/ml mit dem Verdünnungsmedium Dako Diluent S0809 (Dako, Glostrup, Denmark). Die Inkubation erfolgte bei 4°C im Kühlschrank über Nacht. Anschließend wurden die Schnittpräparate gewaschen mit TBST für 3x 5min.

Verwendet wurde als Sekundärantikörper (Link) der biotinfreie Advance HRP Link (anti rabbit SAK) aus dem benutzten Kit Advance HRP K4067 (Dako, Glostrup, Denmark). Inkubiert wurde 30min bei Raumtemperatur und anschließend gewaschen 3x 5min mit TBST. Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit dem Advance HRP Enzyme bei Raumtemperatur, gefolgt von drei weiteren fünfminütigen Waschungen mit TBST.

In einem letzten Inkubationsschritt wurde nun das Farbsubstrat hinzugegeben, Liquide DAB+Substrate ImmPACT (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), bestehend aus 1000µl Buffer und 30µl DAB. Die Inkubationszeit betrug 4min, anschließend wurde 2x 5min mit Aqua dest. gespült.

Als Gegenfärbung folgte eine 40-sekündige Hämatoxilin-färbung nach Meyer (Romeis, 2010) und 7-minütiges Bläuen in Leitungswasser.

Die Dehydrierung erfolgte mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (96%, 100%) für 2x 3min bzw. 2x 5min und abschließend 3x 5min mit Xylol.

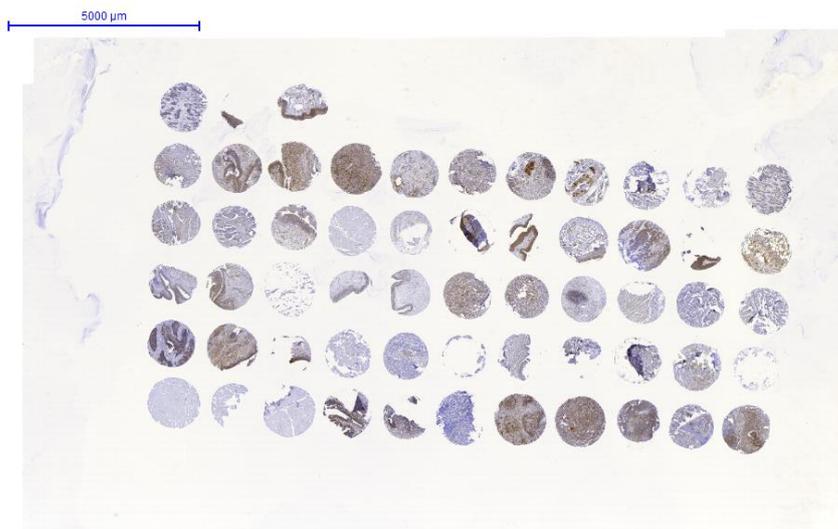
Die nun fertig gefärbten Schnittpräparate wurden eingedeckt mit Hilfe des VectaMount (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA).

Zur Qualitätskontrolle diente parallel das positive Kontrollgewebe eines Hodentumors.

2.4 Beurteilung des Expressionsverhaltens

Zur Beurteilung der TMAs wurden die Objektträger digitalisiert (Pannoramic DESK, 3DHistech Ltd, Budapest, Ungarn). Die Betrachtung der Stanzen erfolgte anonymisiert und ohne das Wissen um die klinisch-pathologischen Parameter des jeweiligen Gewebes. Lediglich die K-Nummer der Pathologie und die Nummer des Geberparaffinblocks waren jedem Dot zugeordnet. So war bei Entblindung eine eindeutige Zuordnung möglich. Zum Einsatz kam die Software Pannoramic Viewer (3DHistech Ltd, Budapest, Ungarn). Beispielbilder konnten ebenfalls mit dieser Software festgehalten werden (siehe Abb. 3A).

Die Ergebnisse wurden auf einem für jeden der vier TMAs mit Excel individuell erstellten Dokumentationsblatt festgehalten (Excel 2011[®], Microsoft Germany, Unterschleißheim). Die Anordnung der Stanzen auf den TMA-Blöcken entsprach dabei der Anordnung der Felder auf dem verwendeten Dokumentationsblatt (siehe Abb. 3B).



A

Material und Methoden

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	K 2867 0306 Block 29 Tumor	K 2867 0306 Block 23 benign	K 2867 0306 Block 23 benign								
2	K 8188 0306 Block 30 Tumor	K 8136 0306 Block 16 benign	K 8136 0306 Block 16 benign	K 8136 0306 Block 19 Tumor	K 8054 0306 Block 29 Tumor	K 8054 0306 Block 19 Tumor	K 8054 0306 Block 19 benign	K 8054 0306 Block 19 benign	K 2078 0306 Block 16 Tumor	K 2078 0306 Block 19 Tumor	K 2867 0306 Block 29 Tumor
3	K 8238 0306 Block 17 Tumor	K 8238 0306 Block 19 Tumor	K 8238 0306 Block 17 benign	Schweinemuskel	K 8238 0306 Block 19 benign	K 1720 0306 Block 17 Nav177	K 1720 0306 Block 17 benign	K 1720 0306 Block 40 benign	K 9174 0306 Block 4 Tumor	K 9174 0306 Block 1 benign	K 8188 0306 Block 30 Tumor
4	K 10784 0306 Block 9 benign	K 10784 0306 Block 44 Tumor	K 10784 0306 Block 40 Tumor	K 10784 0306 Block 31 benign	K 10784 0306 Block 31 benign	K 9273 0306 Block 32 Tumor	K 9273 0306 Block 32 Tumor	K 9273 0306 Block 32 benign	K 9273 0306 Block 32 benign	K 9449 0306 Block 26 Tumor	K 9449 0306 Block 26 Tumor
5	K 8236 0306 Block 14 Tumor	K 8236 0306 Block 6 benign	K 8236 0306 Block 14 benign	Schweinemuskel	K 9189 0306 Block 29 Tumor	K 9189 0306 Block 32 Tumor	K 9189 0306 Block 29 benign	K 9189 0306 Block 26 benign	K 10784 0306 Block 9 Tumor	K 10784 0306 Block 10 Tumor	K 10784 0306 Block 9 benign
6	Schweinemuskel	Schweinemuskel	Schweinemuskel	K 8770 0306 Block 19 Tumor	K 8770 0306 Block 19 Tumor	K 4889 0306 Block 17 Tumor	K 8784 0306 Block 2 Tumor	K 8784 0306 Block 2 Tumor	K 8280 0306 Block 19 Tumor	K 8280 0306 Block 5 Tumor	K 8280 0306 Block 6 Tumor

Abb. 3: (A) Immunhistochemisch gefärbter TMA-Objekträger mit (B) Darstellung der korrespondierenden Auswertetabelle. Gelb: Schweinemuskel als Orientierungshilfe. Eigene Aufnahmen.

Für alle Schnitte erfolgte die Beurteilung am selben Bildschirm und bei gleicher Helligkeit. Ein erster Eindruck konnte bei 10- bzw. 20-facher Vergrößerung gewonnen werden. Für eine genauere Betrachtung und Beurteilung der zellulären Verteilung wurde die 40-fache Vergrößerung hinzugezogen.

In jeweils zwei Durchgängen erfolgte die Auswertung der Marker ohne Kenntnis der Ergebnisse des ersten. Gab es Abweichungen zwischen den beiden Durchläufen, wurde ein drittes Mal, abermals verblindet, ausgewertet.

Anschließend wurden die Daten der fertig ausgefüllten Auswertebögen in die bestehende Datenbank mit klinisch-pathologischen und anderen erhobenen Daten der Patienten übertragen.

2.4.1 Evaluationskriterien für die Auswertung

Für die zelluläre Verteilung aller SSTR-Subtypen ergab sich die Möglichkeit einer zytoplasmatischen, nukleären und membranständigen Expression. Es wurden alle subzellulären Kompartimente beurteilt. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ.

2.4.1.1 Zytoplasmatische Rezeptoren

Zunächst wurde die Expression der zytoplasmatischen Rezeptoren beurteilt. Es zeigten sich innerhalb einer Stanze verschiedene Färbeintensitäten, allerdings ohne vorherrschende Färbeintensität. Um neben der Intensität der Färbung auch deren Ausbreitung optimal zu erfassen, wurde der H-Score, analog zu Maygardens immunhistochemischen Analysen am Prostatakarzinom, verwendet (Maygarden, Novotny, Moul, Bae, & Ware, 1994). In der vorliegenden Untersuchung wurde der H-Score sowohl für Tumor- als auch für Normalgewebe verwendet.

Für die Bestimmung des H-Scores wird die Summe aller urothelialer Tumorzellen (bzw. des benignen Urothels) einer Stanze als 100% festgesetzt. Für jede Stanze wird daraufhin die prozentuale Anzahl der Zellen bestimmt, die jeweils den Intensitäten 0 (keine Färbung) bis 3+ (stark angefärbt) zugerechnet werden können. Um den H-Score zu erhalten, werden die Prozentsätze der einzelnen Färbeintensitätsstufen (Prozentsatz x Intensitätsstufe) addiert (siehe Abb. 4). Die so bestimmten Tumoranteile ergeben in ihrer Summe wieder 100%.

$$\text{H-Score} = (\% 0) \times 0 + (\% 1+) \times 1 + (\% 2+) \times 2 + (\% 3+) \times 3$$

Abb. 4: H-Score (nach Maygarden et al., 1994).

Auf diese Weise ist ein kontinuierliches Ergebnis von 0 bis zum Höchst-Score 300 möglich.

2.4.1.2 Membranständige Rezeptoren

Ebenso wurden die Schnitte in Hinblick auf die Expression membranständiger Rezeptoren beurteilt. Auch hier erfolgte die Auswertung semiquantitativ.

Es zeigte sich, dass auch bei der membranständigen SSTR-Expression nicht immer eine vorherrschende Färbeintensität angegeben werden kann. Deswegen wurde für die Evaluation der Membran ebenfalls der zuvor beschriebene H-Score angewendet (siehe Abb. 4).

Konnte bei gleichzeitiger zytoplasmatischer Färbung die Zellgrenze nicht erkannt werden, wurde von einer gleichstarken Färbung von Membran und Zytoplasma ausgegangen und entsprechend gleich bewertet.

2.4.1.3 Nukleäre Rezeptoren

Eine Braunfärbung der Zellkerne konnte nur vereinzelt beobachtet werden und war zumeist unspezifisch und wurde deswegen nicht erhoben.

2.5 Statistische Auswertungen der Datenbank

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des Statistikprogramms JMP (Version 13, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Das festgelegte Signifikanzniveau der statistischen Tests betrug $p < 0,05$ (5%).

Für die demographischen und anderen Größen des Patientenkollektivs wie Alter bei Operation, Geschlecht und TNM-Stadium wurden Median, Standardabweichung SD, Mittelwert und Häufigkeitsverteilungen mit Quartilen erhoben. Auch für die Daten des Follow-ups, tumorspezifisches Überleben und Gesamtüberleben, wurden statistische Kenngrößen und Häufigkeitsverteilungen erhoben.

Für die Zielgrößen Färbeintensität der zytoplasmatischen und membranständigen SST-Rezeptoren wurden ebenfalls zuerst die statistischen Kenngrößen und Häufigkeitsverteilungen erhoben. Es folgte der Vergleich der Zielgrößen in Tumor- und Normalgewebe mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test und folgender Chi-Quadrat-Approximation (Kruskal, 1952).

Zur besseren Beurteilung erfolgte die Dichotomisierung folgendermaßen: Das Alter zum Zeitpunkt der OP in $0 < \text{Median}$ und $1 \geq \text{Median}$ (Median: 69 Jahre), T-Stadium $0 < pT3$ und $1 \geq pT3$, N-Stadium in $0 = N0$ und $1 \geq N1$. Die Gegenüberstellung der Zielvariablen SSTR-Expression in Tumorgewebe mit den TNM-Stadien erfolgte jeweils für die membranständige und die zytoplasmatische

Färbung in univariaten Analysen mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test und Chi-Quadrat-Approximation (Kruskal, 1952).

Die Interaktion der SSTR-Subtypen wurde mittels linearer Regressionsanalyse bestimmt, zuerst für die membranständigen SSTR, danach für die zytoplasmatischen SSTR.

Der Zusammenhang zwischen Patientencharakteristika wie Alter und Geschlecht mit den Zielvariablen erfolgte in einfaktorieller Analyse mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test und damit einhergehender Chi-Quadrat-Approximation.

Für die Ergebnisse des Krankheitsverlaufs, Auftreten eines Rezidives, tumorabhängiges Versterben und Gesamtüberleben wurden statistische Kenngrößen (Median, SD, Mittelwert) und Häufigkeitsverteilungen mit Quartilen erhoben. Die Untersuchung des Zusammenhangs mit den Zielgrößen im Tumorgewebe erfolgte mit dem Log Rang-Test und die Darstellung der Ergebnisse durch Kaplan-Meier-Kurven (Kaplan, 1958; Mantel, 1966). Dichotomisierung der SSTR-Expression in $0 < \text{Median}$ und $1 \geq \text{Median}$.

Zuletzt wurde mittels multivariater Analysen, der Cox-Regressionsanalyse, die Unabhängigkeit des Einflusses von verschiedenen Prädiktoren auf den Krankheitsverlauf geprüft (Cox, 1972).

2.6 Ethik

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Verbundprojektes *„Retrospektive immunhistochemische Untersuchungen zur Expression onkologisch relevanter Proteinparameter beim muskelinvasiven Urothelkarzinom der Harnblase mittels der Tissue Micro Array Technik“*, innerhalb dem verschiedene Dissertationen zur Thematik angefertigt wurden. Der Ethikantrag hierfür wurde der Tübinger Ethikkommission bereits vorgelegt und bewilligt, das gesamte Vorhaben der Gewebeuntersuchungen mittels Tissue Microarray erhielt die Nummer 279/2013BO2, die individuellen Nachbeobachtungen der Krankheitsverläufe wurden mit Votum 647/2917BO2 bewilligt.

2.7 Datenschutz

Der Umgang mit Patientendaten erfolgte unter Einhaltung der ärztlichen Schweigepflicht und Berücksichtigung der Datenschutzauflagen. Es waren nur Personen an den Untersuchungen und Erhebungen der klinischen Verlaufsdaten beteiligt, die der Schweigepflicht unterliegen.

Nach Abschluss der Erhebungsphase der klinischen Daten wurde das Patientenkollektiv vollständig anonymisiert. Name und Geburtsdatum wurden entfernt und den Patienten stattdessen fortlaufende Nummern zugeteilt. Eine Rückverfolgung etwa durch Geburtsdaten oder Initialen wird somit ausgeschlossen.

2.8 Verwendete Software

- Literaturverwaltung: EndNoteX7 (Thomson Reuters, New York, USA)
- Statistische Auswertung: JMP 10.0[®] (Version 13, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)
- Datenbankerstellung: Microsoft Excel 2011[®] (Microsoft Germany, Unterschleißheim)
- Verfassung der Dissertation: Microsoft Word 2011[®] (Microsoft Germany, Unterschleißheim)
- Betrachten und Auswertung der Scans: Panoramic Viewer (3DHistech Ltd, Budapest, Ungarn)

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Ausgewertet wurden die Daten von 103 Patienten, die sich einer radikalen Zystektomie eines muskelinfiltrierenden Harnblasenkarzinoms an der Klinik für Urologie des Universitätsklinikums Tübingen unterzogen haben. Die Patienten wiesen mindestens ein Tumorstadium T2a und größer auf. Die Operationen fanden zwischen 1996 und 2006 statt.

3.1.1 Patientendaten

Der jüngste der erfassten 103 Patienten war zum Zeitpunkt der Operation 32 Jahre alt, der älteste 84 Jahre (Mittelwert 66 Jahre, Median 69 Jahre, SD 10,8 Jahre). Von den 103 untersuchten Patienten waren 79 (77%) männlich und 24 (23%) weiblich (siehe Tab. 4).

3.1.2 Tumorklassifikation

Von allen 103 untersuchten Patienten konnte die Infiltration des Primärtumors festgestellt werden (T-Stadium). Die Stadien reichten von T2a (n=17, 16%) bis T4b (n=6, 6%). Die häufigsten erfassten Tumorstadien waren mit jeweils 24 Patienten T3a und T3b (jeweils 23%).

Die Zahl der befallenen Lymphknoten konnte bei 99 der 103 Patienten erhoben werden. Bei den meisten Patienten (n=58, 59%) fanden sich keine regionalen Lymphknotenmetastasen. 2 Patienten (2%) hatten mit N3 das höchste N-Stadium.

Fernmetastasen (M-Stadium) konnten bei 99 Patienten beurteilt werden. 90 Patienten (91%) wiesen zum Zeitpunkt der Operation keine Fernmetastasen auf. Die anderen 9 Patienten wiesen bereits Fernmetastasen (M1, 9%) auf.

Von allen 103 Patienten konnten Daten zum histologischen Grading erhoben werden. Dass muskelinvasive Harnblasenkarzinome in der Regel schlecht differenziert sind zeigt sich an der Verteilung des Gradings. 78 Patienten hatten G3-Tumore (76%), 25 Patienten (24%) G2-Tumore (siehe Tab. 4).

Ergebnisse

Parameter	Median	n	%
Alter zum Zeitpunkt der Operation (n=103)	69		
Geschlecht (n=103)			
Männlich		79	77
Weiblich		24	23
T-Stadium (n=103)	T3a		
T2a		17	16
T2b		14	14
T3a		24	23
T3b		24	23
T4a		18	17
T4b		6	6
N-Stadium (n=99)	0		
N0		58	59
N1		24	24
N2		15	15
N3		2	2
M-Stadium (n=99)	0		
M0		90	91
M1		9	9
Grading (n=103)	3		
G1		0	
G2		25	24
G3		78	76

Tab. 4: Patientenkollektiv, Patientenverteilung und Tumorklassifikation.

3.2 Immunhistochemische Ergebnisse

Die SSTR-Subtypen 1 bis 5 konnten allesamt immunhistochemisch nachgewiesen und unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden. Die Expression der Rezeptoren zeigte sich sowohl in Normal- als auch im Tumorgewebe. Auf dem TMA wurden die gut beurteilbaren Stenzen bewertet. Die Färbung stellte sich von hell- bis dunkelbraun dar.

Die Tumorzellen waren in einigen Stenzen diffus im umliegenden Gewebe verteilt, in anderen als massive Cluster erkennbar.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Immunhistochemie für die einzelnen Subtypen erläutert.

3.2.1 SSTR1

Für den SSTR1 zeigten sich die Membranen in vielen Fällen homogen gefärbt. Das Zytoplasma dagegen zeigte innerhalb einer Stanze eine überwiegend heterogene Färbung des Zytoplasmas unter Aussparung der Zellkerne (s. Abb. 5). In manchen Fällen zeigte sich eine zum Lumen hin höhere Färbeintensität der Zellen.

Eine rein nukleäre Färbung wurde nicht beobachtet und soll im Folgenden auch nicht in die Wertung einfließen. Allenfalls in wenigen Einzelfällen konnte eine unspezifische Färbung beobachtet werden.

Es konnte jeweils zwischen Geweben mit geringer, mäßiger und starker membranständiger und zytoplasmatischer Expression unterschieden werden.

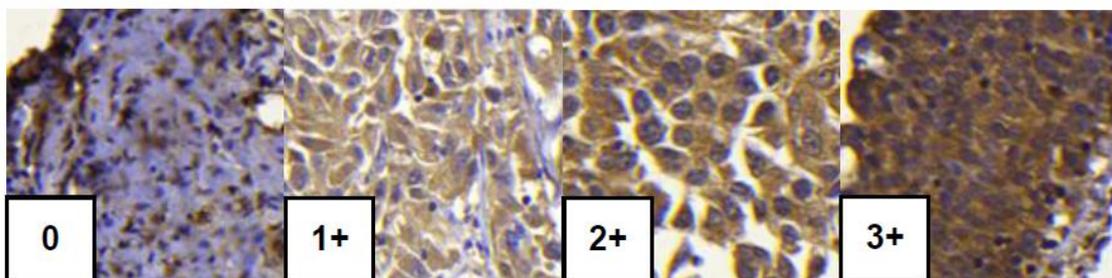


Abb. 5: Färbung gegen SSTR1, Braunfärbung der Zellen. Vergrößerung 1:400, 0 bis 2+ Tumorgebe, 3+ benignes Gewebe. Jeweils homogene Färbung von Membran und Zytoplasma unter Aussparung des Zellkerns.

Ergebnisse

Die statistische Auswertung der erhobenen Ergebnisse soll im Folgenden erläutert werden.

3.2.1.1 Statistische Kenngrößen

Im urothelialen Normalgewebe ergaben sich für die membranöse Färbung H-Score Werte zwischen 120 und 300 (Median 300, Mittelwert 276, SD 46). Im Zytoplasma des urothelialen Normalgewebes zeigten sich Werte zwischen 110 und 300 (Median 230, Mittelwert 224, SD 52).

Im Tumorgewebe konnten für die membranöse Färbung Werte zwischen 100 und 300 erreicht werden (Median 200, Mittelwert 214, SD 52). Für die zytoplasmatische Färbung ergaben sich ebenfalls Werte zwischen 100 und 300 (Median 194, Mittelwert 194, SD 49).

3.2.1.2 Vergleich der membranösen Expression in Normal- und Tumorgewebe

Für den Vergleich der membranösen SSTR1-Expression in Normal- und Tumorgewebe stellte sich in der einfaktoriellen Analyse mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test mit $p < 0,0001$ ein signifikantes Ergebnis dar. Membranen in benignem Gewebe exprimierten mehr SST-Rezeptoren als Membranen in Tumorgewebe (s. Abb. 6).

Ergebnisse

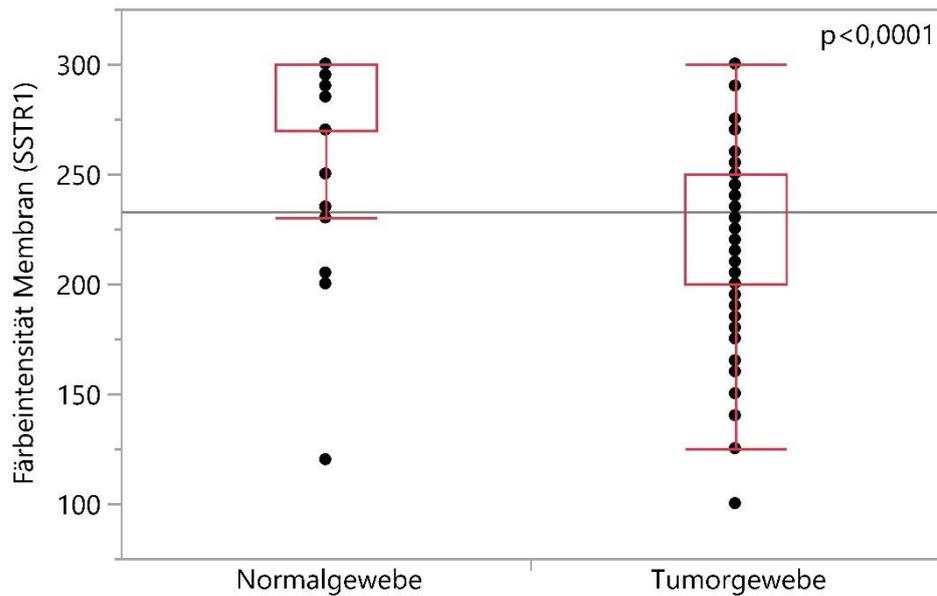


Abb. 6: Vergleich der membranösen Expression von SSTR1 in Normal- und Tumorgewebe, H-Score, einfaktorielles Analyse (Wilcoxon Test, $p < 0,0001$).

3.2.1.3 Vergleich der zytoplasmatischen Expression in Normal- und Tumorgewebe

Der Vergleich der zytoplasmatischen Expression von SSTR1 in Normal- und Tumorgewebe zeigte in der einfaktoriellem Analyse mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test mit $p = 0,0016$ ein signifikantes Ergebnis. Benignes urotheliales Zytoplasma exprimiert mehr SSTR1 als Zytoplasma in Tumorgewebe (siehe Abb. 7).

Ergebnisse

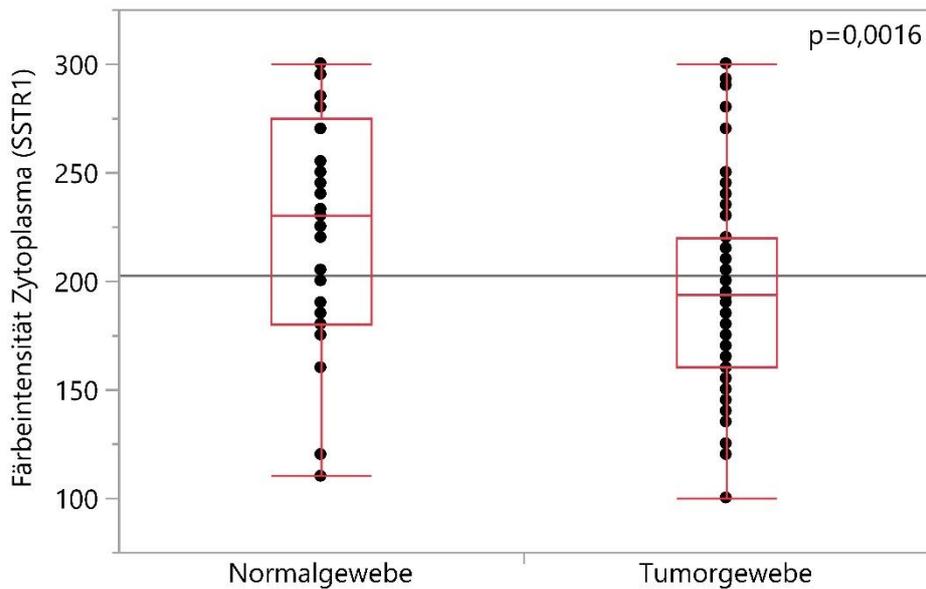


Abb. 7: Vergleich der zytoplasmatischen Expression von SSTR1 in Normal- und Tumorgewebe, H-Score, einfaktorielle Analyse (Wilcoxon Test, $p=0,0016$).

3.2.1.4 Korrelation mit TNM-Klassifikation und Grading

3.2.1.4.1 T-Stadium

Mit $p=0,0477$ konnte in Tumorgewebe ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium T und der Expression membranständiger SSTR1 nachgewiesen werden. Bei geringerer Tiefeninfiltration des Tumors wurden mehr SSTR1 an den Membranen exprimiert (s. Abb. 8).

Ebenso konnte mit $p=0,0424$ ein signifikanter Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen SSTR1-Expression und dem T-Stadium dargestellt werden. Auch hier zeigte sich eine vermehrte SSTR1-Expression bei geringerer Tiefeninfiltration beziehungsweise schwächere SSTR1-Expression im Zytoplasma invasiverer Tumoren (s. Abb. 9).

Ergebnisse

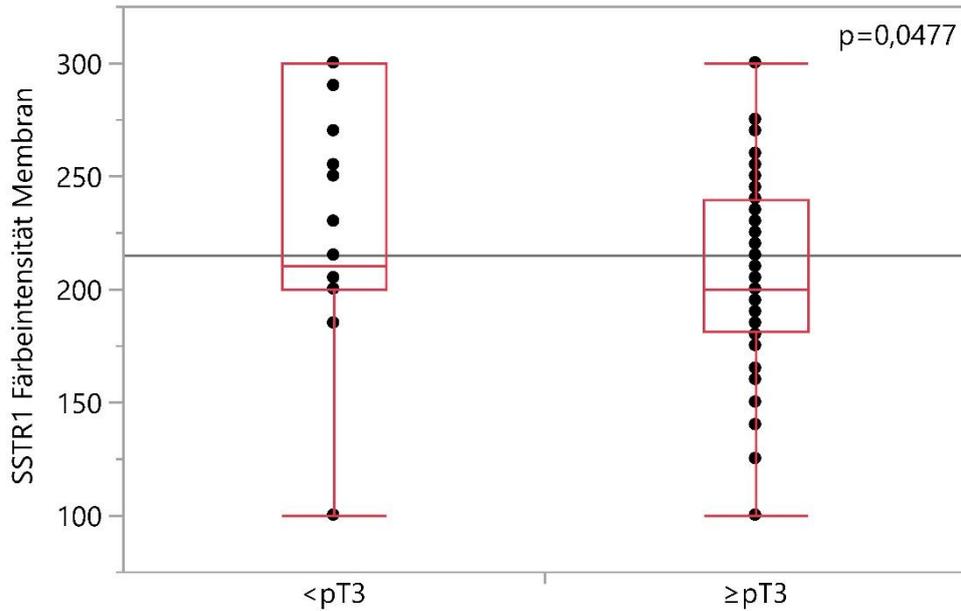


Abb. 8: Korrelation der membranständigen SSTR1-Expression mit dem T-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,0477$.

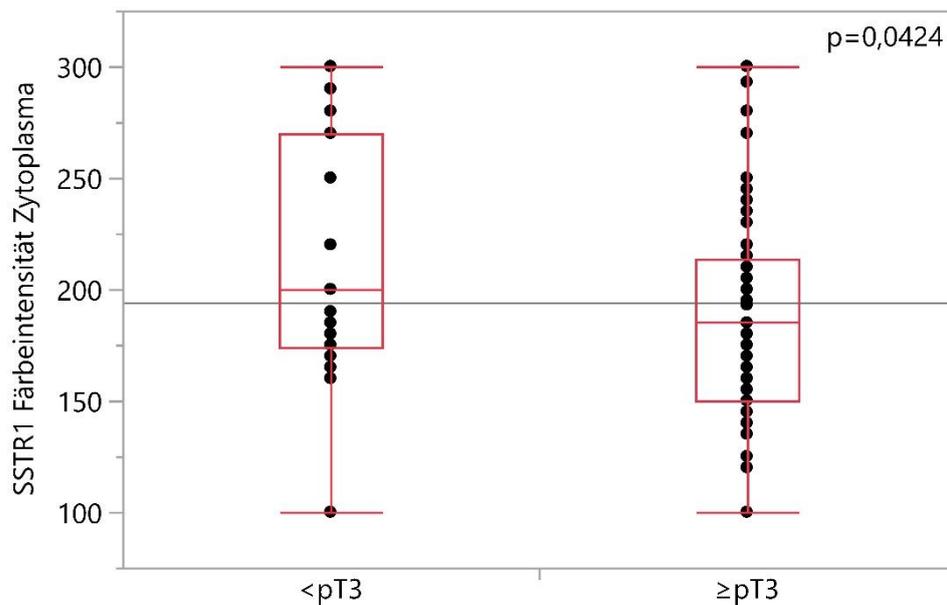


Abb. 9: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR1-Expression mit dem T-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,0424$.

3.2.1.4.2 N-Stadium

Für die Korrelation von SSTR1 mit dem Lymphknotenstatus der Patienten konnte in Tumorgewebe weder für die membranständige noch die zytoplasmatische Expression ein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden (s. Abb. 10 und 11).

Ergebnisse

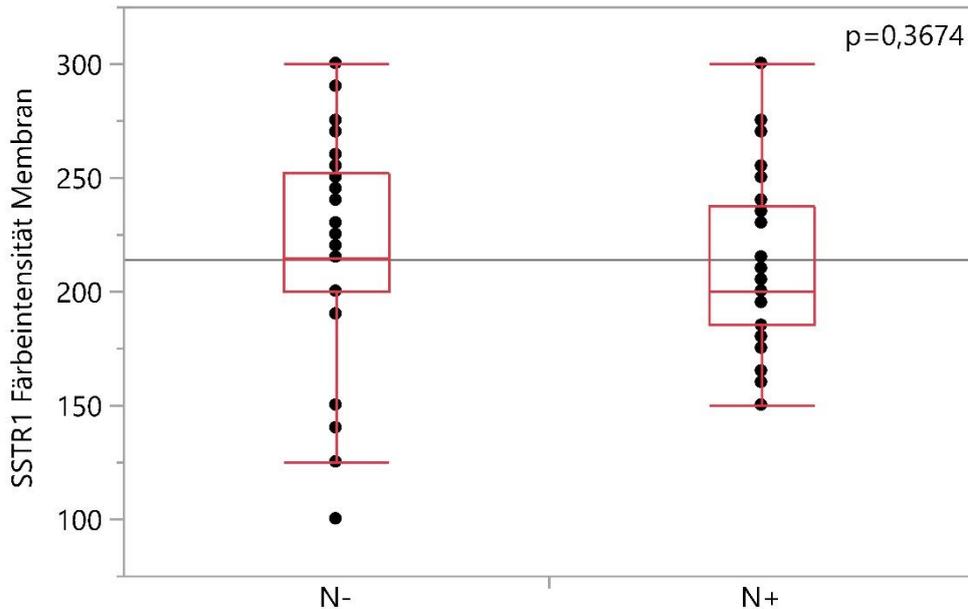


Abb. 10: Korrelation der membranständigen SSTR1-Expression mit dem N-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,3674$.

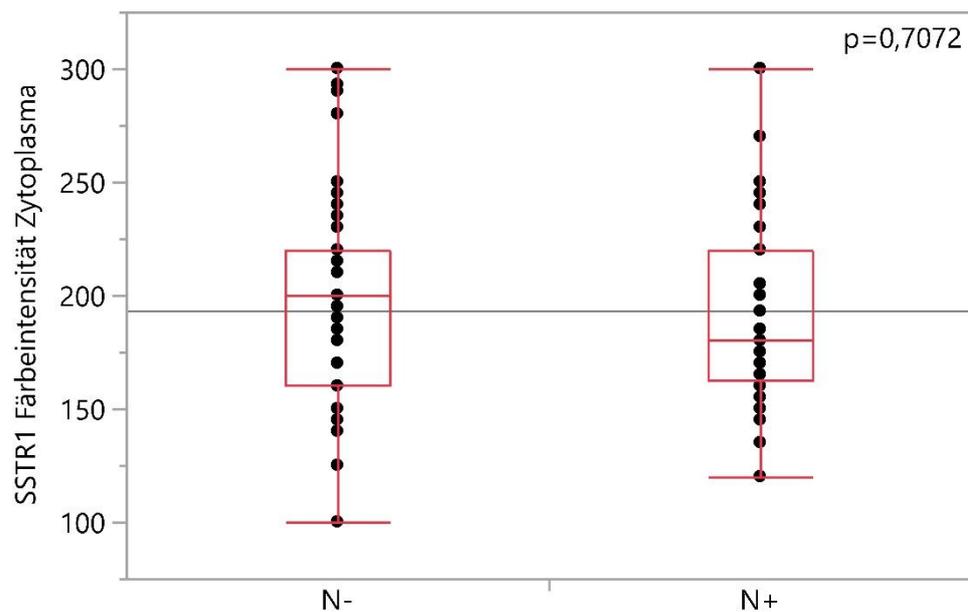


Abb.11: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR1-Expression mit dem N-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,7072$.

3.2.1.4.3 M-Stadium

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der SSTR1-Expression in Membranen und Zytoplasma des Tumorgewebes und dem Ausmaß der Fernmetastasierung festgestellt werden (s. Abb. 12 und 13).

Ergebnisse

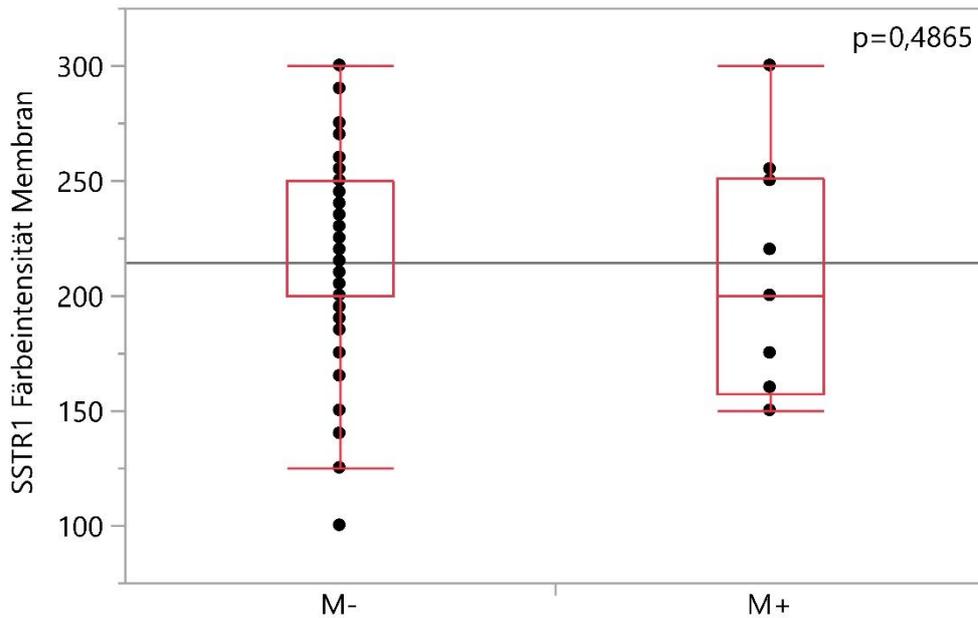


Abb. 12: Korrelation der membranständigen SSTR1-Expression mit dem M-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,4865$.

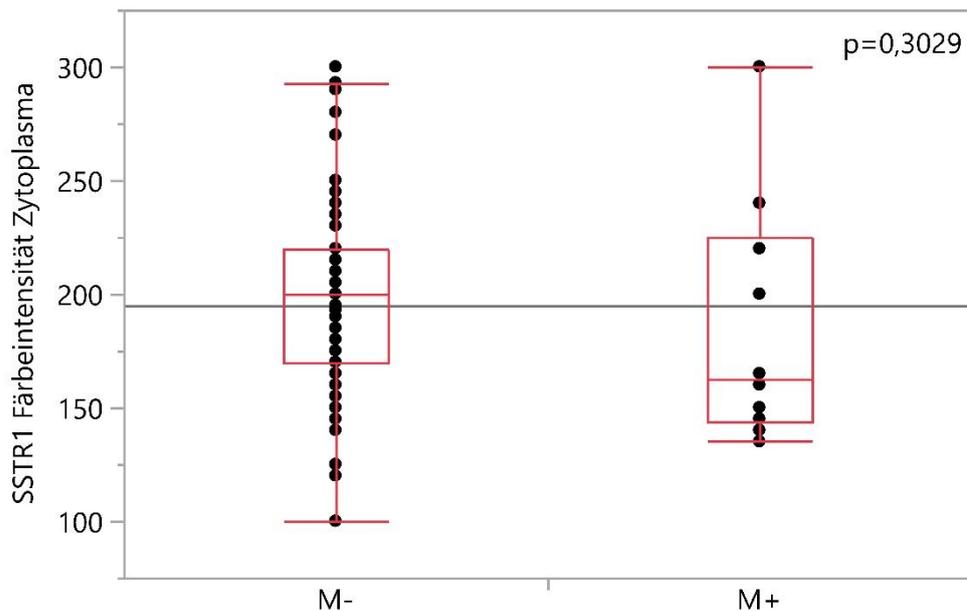


Abb. 13: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR1-Expression mit dem M-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,3029$.

3.2.1.4.4 Grading

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang hergestellt werden zwischen Grading und der SSTR1-Expression in Membranen und Zytoplasma des Tumorgewebes (s. Abb. 14 und 15).

Ergebnisse

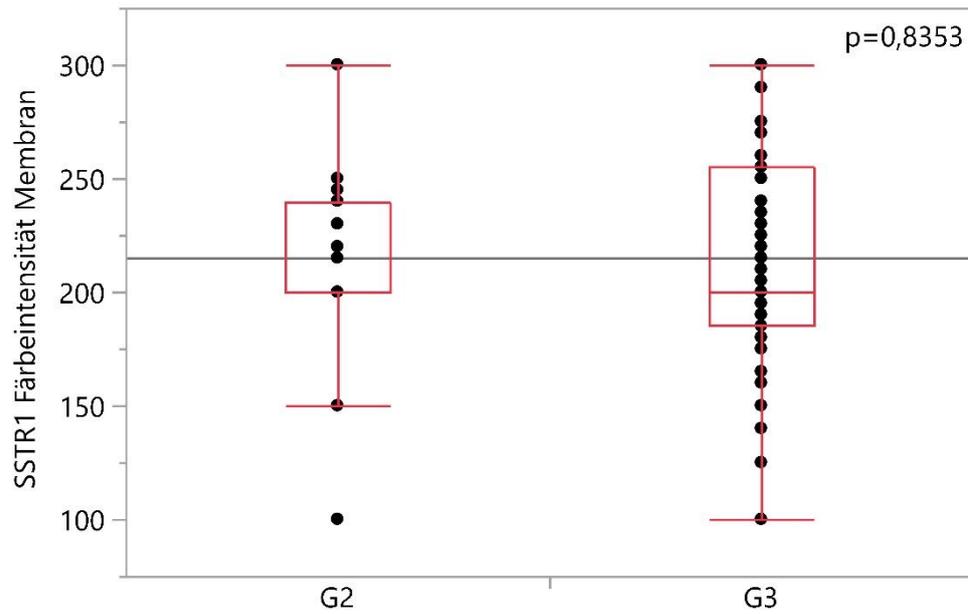


Abb. 14: Korrelation der membranständigen SSTR1-Expression mit dem Grading; Wilcoxon-Test; $p=0,8353$.

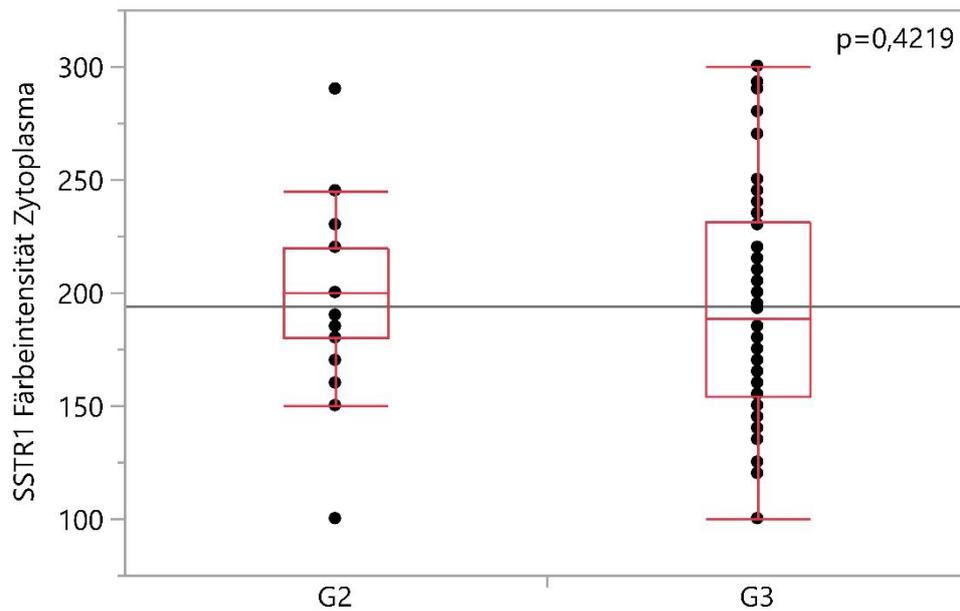


Abb. 15: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR1-Expression mit dem Grading; Wilcoxon-Test; $p=0,4219$.

3.2.2 SSTR2

Die Färbung des SSTR2 zeigte sich ebenfalls membranständig und zytoplasmatisch in verschiedenen Brauntönen (s. Abb.16). Eine Färbung des Zellkerns wurde nur in Einzelfällen beobachtet und soll nicht in die Auswertung mit einfließen.

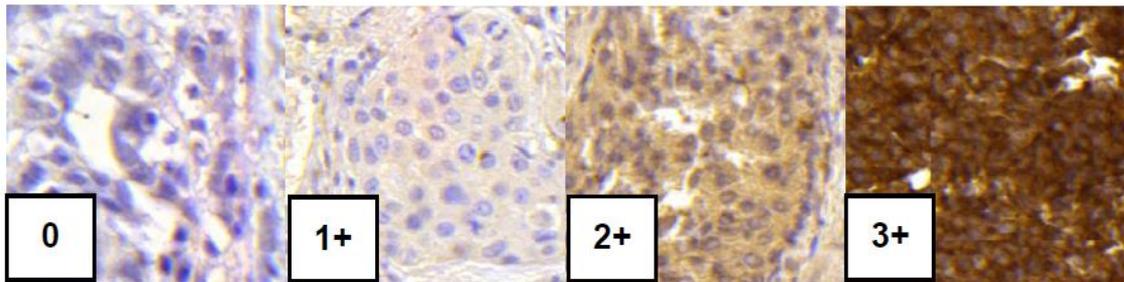


Abb. 16: Färbung gegen SSTR2, Braunfärbung des Zytoplasmas und der Membranen, Zellkerne ausgespart. Vergrößerung 1:400, Tumorgewebe.

3.2.2.1 Statistische Kenngrößen

In den Membranen des Normalgewebes ergaben sich Werte zwischen 100 und 230 (Median 200, Mittelwert 174,4, SD 41,9), im Zytoplasma zwischen 100 und 210 (Median 160, Mittelwert 159, SD 36,1).

In den Membranen des Tumorgewebes fanden sich Werte zwischen 0 und 300 (Median 177,5, Mittelwert 158,1, SD 53,8). Im Zytoplasma des Tumorgewebes ergaben sich ebenfalls Werte zwischen 0 und 300 (Median 165, Mittelwert 154,1, SD 52,4).

3.2.2.2 Vergleich der membranösen Expression in Normal- und Tumorgewebe

Beim Vergleich der SSTR2-Expression in Membranen des Normal- und Tumorgewebes ergab sich ein signifikantes Ergebnis mit $p=0,0193$. Membranen des Normalgewebes exprimierten mehr SSTR2 als Membranen des Tumorgewebes (s. Abb. 17).

Ergebnisse

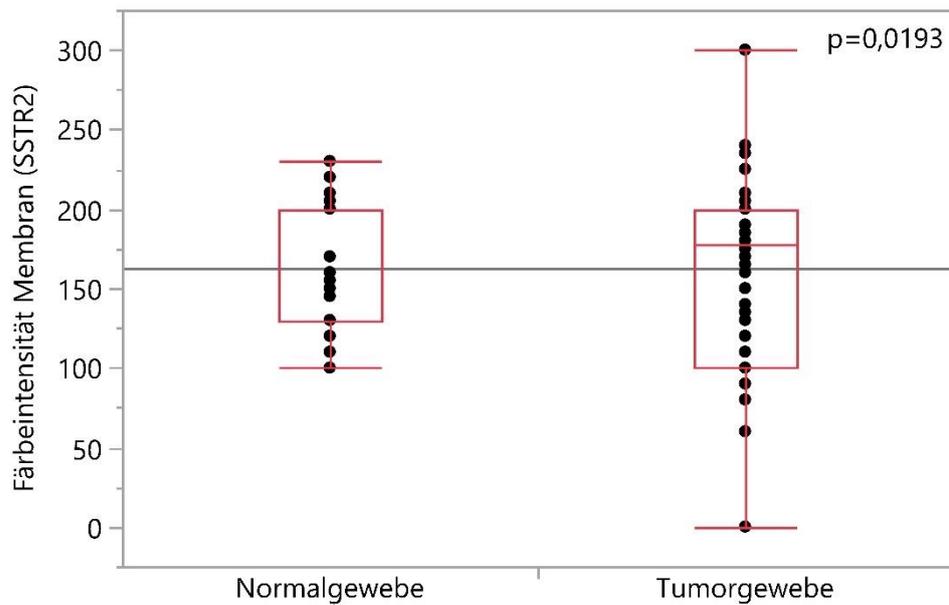


Abb. 17: Vergleich der membranösen Expression von SSTR2 in Normal- und Tumorgewebe, H-Score, einfaktorielles Analyse (Wilcoxon Test, $p=0,0193$).

3.2.2.3 Vergleich der zytoplasmatischen Expression in Normal- und Tumorgewebe

Der Vergleich der zytoplasmatischen SSTR2-Expression in Tumor- und Normalgewebe ergab keinen signifikanten Unterschied.

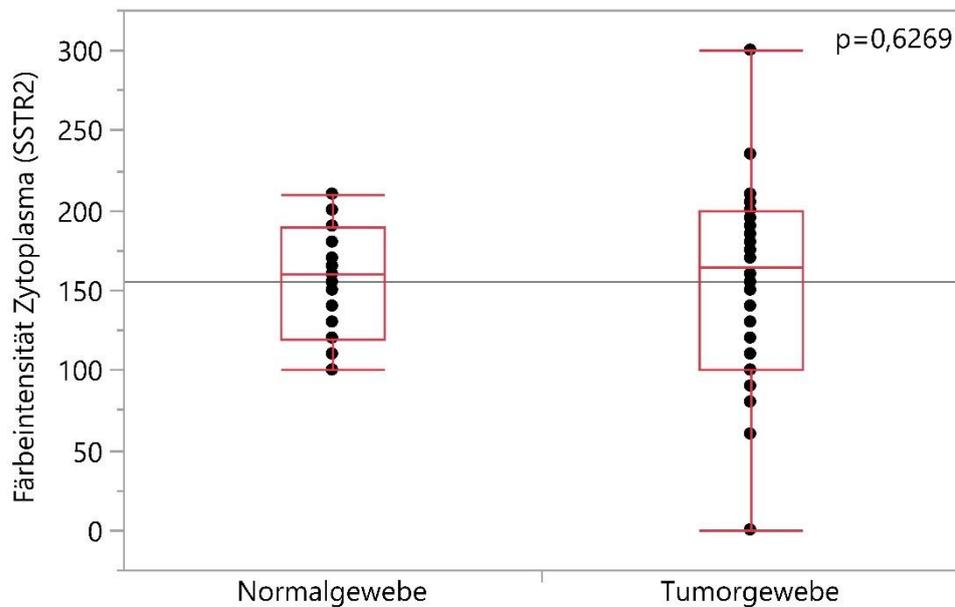


Abb. 18: Vergleich der zytoplasmatischen Expression von SSTR2 in Normal- und Tumorgewebe, H-Score, einfaktorielles Analyse (Wilcoxon Test, $p=0,6269$).

3.2.2.4 Korrelation mit TNM-Klassifikation und Grading

3.2.2.4.1 T-Stadium

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der membranösen und zytoplasmatischen Expression von SSTR2 in Tumorgewebe festgestellt werden (s. Abb. 19 und 20).

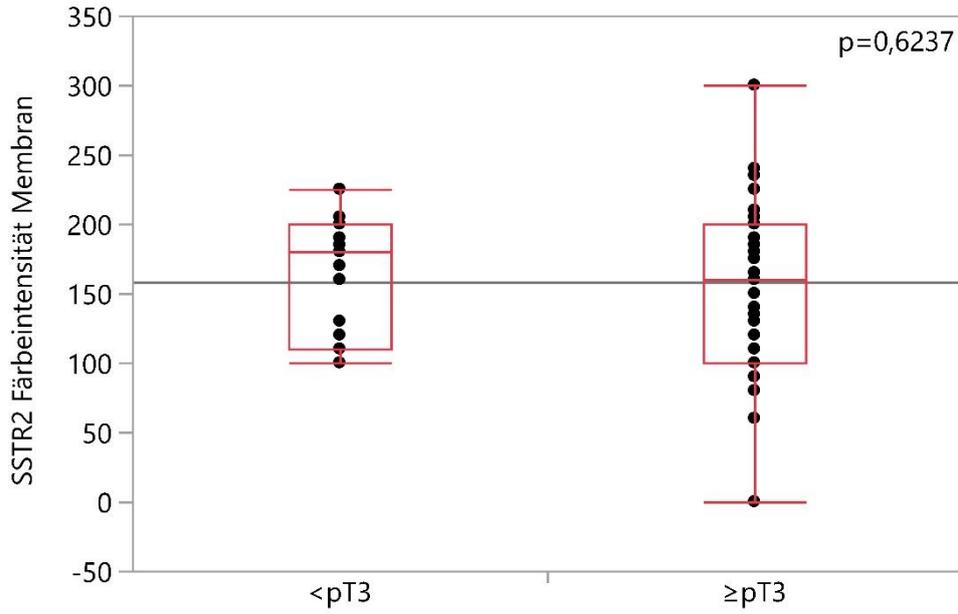


Abb. 19: Korrelation der membranständigen SSTR2-Expression mit dem T-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,6237$.

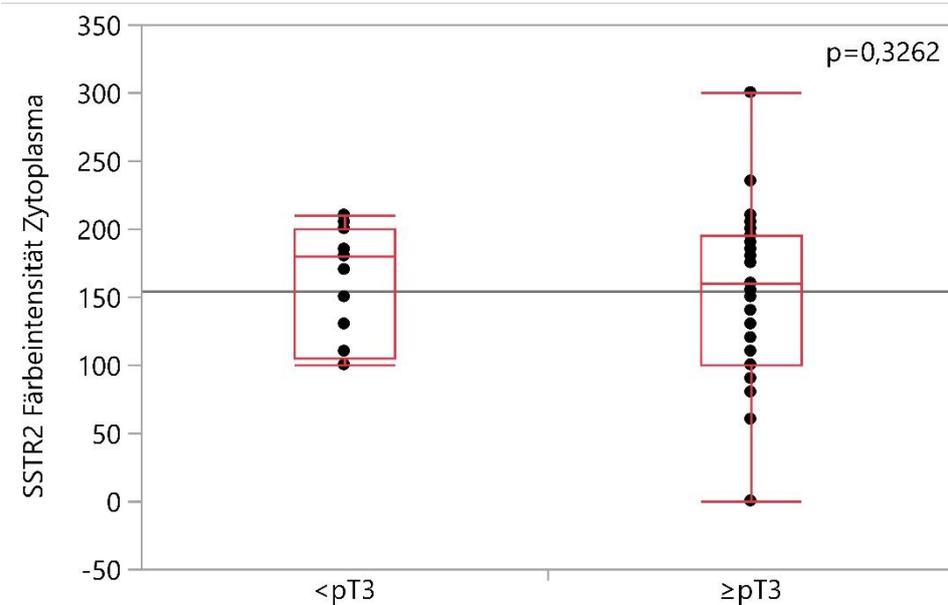


Abb. 20: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR2-Expression mit dem T-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,3262$.

Ergebnisse

3.2.2.4.2 N-Stadium

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der membranösen und zytoplasmatischen SSTR2-Expression in Tumorgewebe und dem Lymphknotenbefall der Patienten festgestellt werden (s. Abb. 21 und 22).

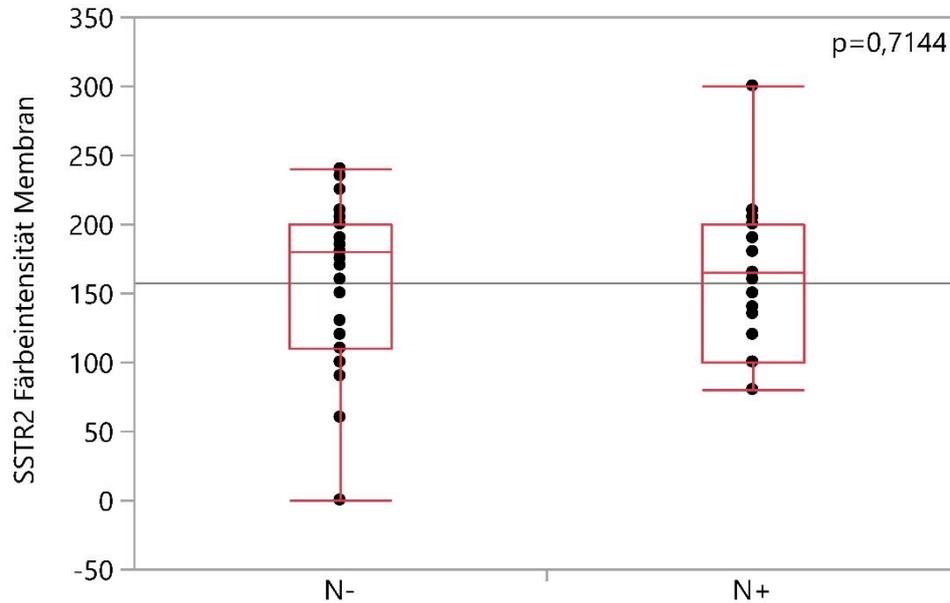


Abb. 21: Korrelation der membranständigen SSTR2-Expression mit dem N-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,7144$.

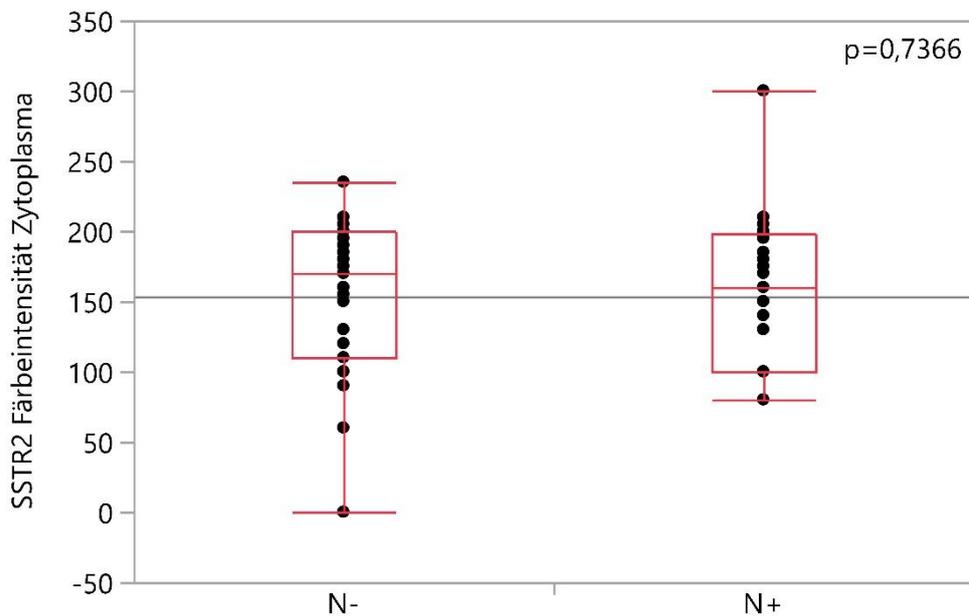


Abb. 22: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR2-Expression mit dem N-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,7366$.

Ergebnisse

3.2.2.4.3 M-Stadium

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der SSTR2-Expression in Membranen und Zytoplasma des Tumorgewebes und dem M-Stadium festgestellt werden (s. Abb. 23 und 24).

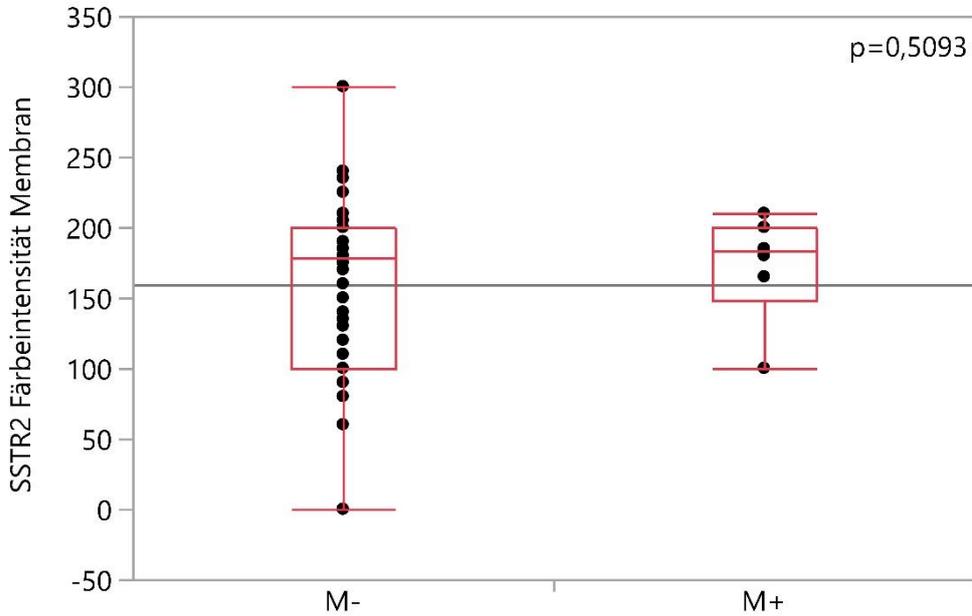


Abb. 23: Korrelation der membranständigen SSTR2-Expression mit dem M-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,5093$.

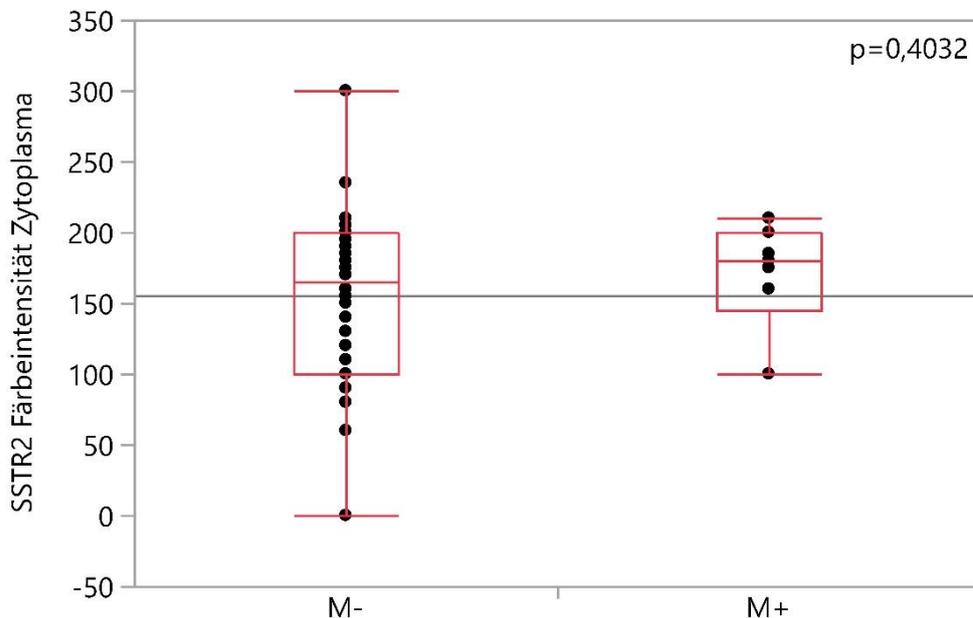


Abb.24: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR2-Expression mit dem M-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,4032$.

3.2.2.4.4 Grading

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der membranösen und zytoplasmatischen SSTR2-Expression in Tumorgewebe und dem Grading festgestellt werden (s. Abb. 25 und 26).

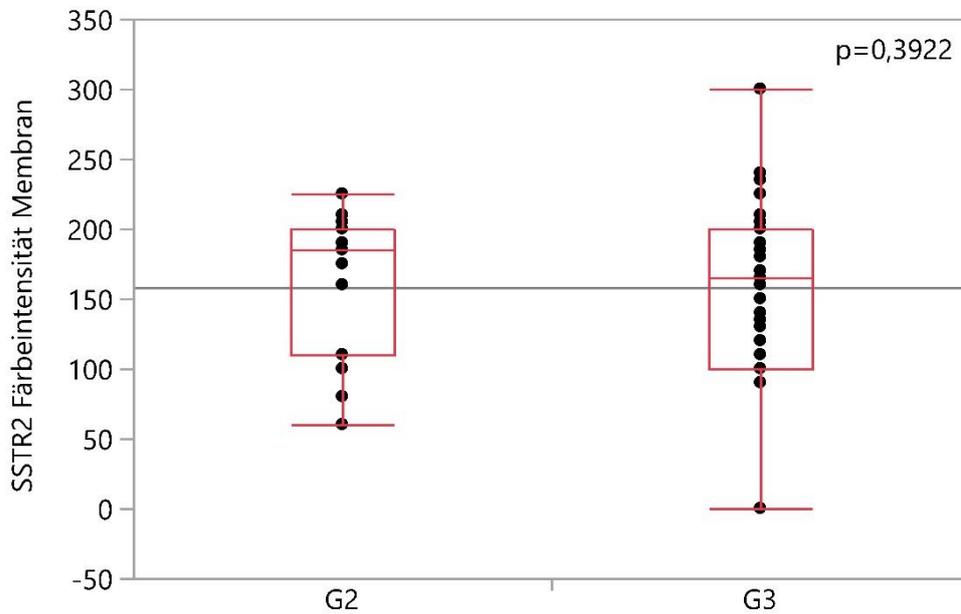


Abb. 25: Korrelation der membranständigen SSTR2-Expression mit dem Grading; Wilcoxon-Test; $p=0,3922$.

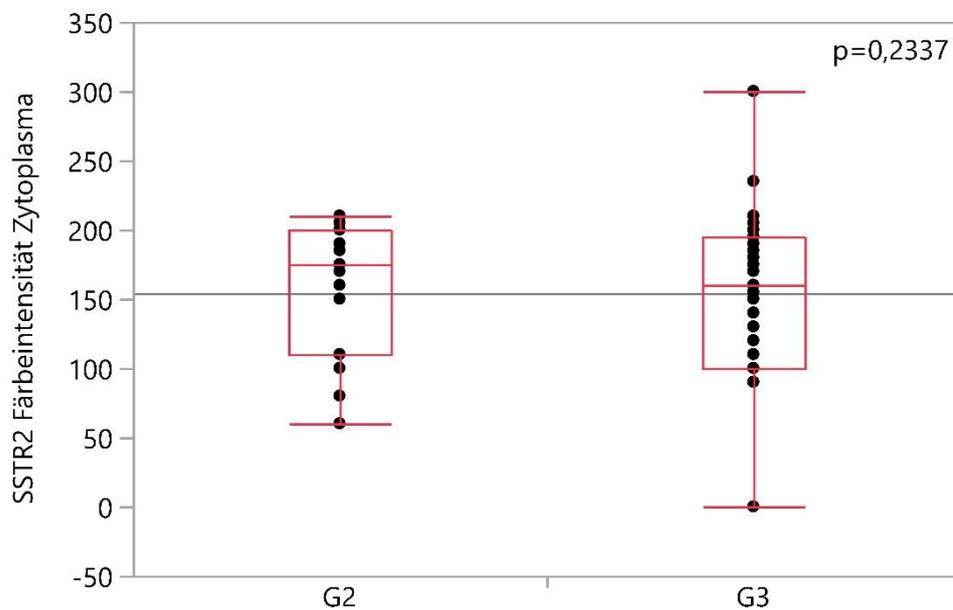


Abb. 26: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR2-Expression mit dem Grading; Wilcoxon-Test; $p=0,2337$.

3.2.3 SSTR3

Auch für den SSTR3 konnten Färbungen der Membran und des Zytoplasmas gezeigt werden. Die membranständige Färbung verteilte sich eher homogen über das Urothelgewebe. Die zytoplasmatische Färbung des SSTR3 zeigte sich eher inhomogen in verschiedenen Brauntönen.

Vereinzelt war eine geringe Braunfärbung des Zellkerns sichtbar, die jedoch in der weiteren Beurteilung nicht berücksichtigt wurde. Eine rein nukleäre Färbung konnte nicht beobachtet werden (s. Abb. 27).

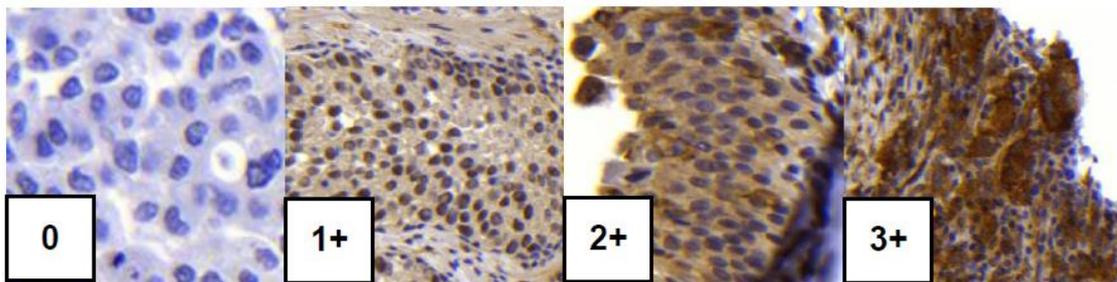


Abb. 27: Färbung gegen SSTR3, Braunfärbung der Zellen. Vergrößerung 1:400, 0, 1+ und 3+ Tumorgebe, 2+ benignes Gewebe. 1+ bis 3+: membranständige und zytoplasmatische Expression; bei 1+ teils nukleäre Expression.

Die statistische Auswertung der erhobenen Ergebnisse soll im Folgenden erläutert werden.

3.2.3.1 Statistische Kenngrößen

Im Normalgewebe zeigten sich bei der membranständigen SSTR3-Expression Werte zwischen 0 und 220 (Median 175, Mittelwert von 145,6, SD 71,9). Für die zytoplasmatische Expression ergaben sich ebenfalls Werte von 0 bis 220 (Median 162,5, Mittelwert 137, SD 71,5).

In den Membranen des Tumorgewebes konnten Werte des H-Scores zwischen 0 und 300 (Median 47,5, Mittelwert 61, SD 67,8) festgestellt werden, im Zytoplasma zwischen 0 und 235 (Median 45, Mittelwert 57, SD 62).

3.2.3.2 Vergleich der membranösen Expression in Normal- und Tumorgewebe

Im Vergleich der membranständigen Expression von SSTR3 in Normal- und Tumorgewebe ergab die einfaktorielle Analyse mittels Wilcoxon/Kruskal-Wallis-Test mit $p < 0,0001$ ein signifikantes Ergebnis. Benigne urotheliale Membranen exprimierten mehr SSTR3 als Membranen in Tumorgewebe.

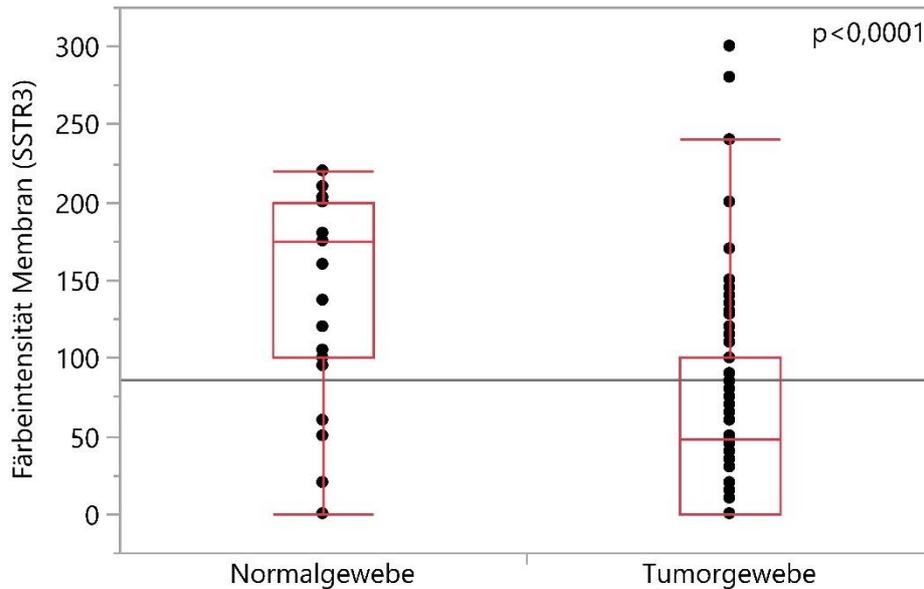


Abb. 28: Vergleich der membranösen Expression von SSTR3 in Normal- und Tumorgewebe, H-Score, einfaktorielle Analyse (Wilcoxon Test, $p < 0,0001$).

3.2.3.3 Vergleich der zytoplasmatischen Expression in Normal- und Tumorgewebe

Mit $p < 0,0001$ lag für den Vergleich der zytoplasmatischen Expression von SSTR3 in Normal- und Tumorgewebe ein signifikantes Ergebnis vor. Benignes urotheliales Zytoplasma exprimierte mehr SSTR3 als Zytoplasma in Tumorgewebe (s. Abb. 29).

Ergebnisse

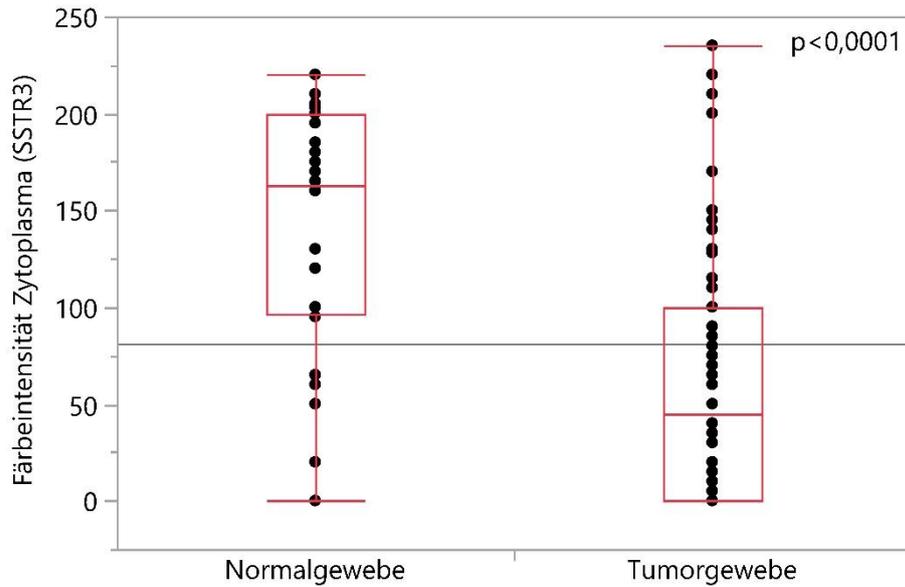


Abb. 29: Vergleich der zytoplasmatischen Expression von SSTR3 in Normal- und Tumorgewebe, H-Score, einfaktorielles Analyse (Wilcoxon Test, $p < 0,0001$).

3.2.3.4 Korrelation mit TNM-Klassifikation und Grading

3.2.3.4.1 T-Stadium

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Tumorstadium T und der Expression membranständiger SSTR3 nachgewiesen werden. Mit $p = 0,092$ zeigte sich allerdings die leichte Tendenz, dass eine vermehrte SSTR3-Expression an den Membranen mit einer geringeren Tiefeninfiltration einherging (s. Abb. 30).

Ergebnisse

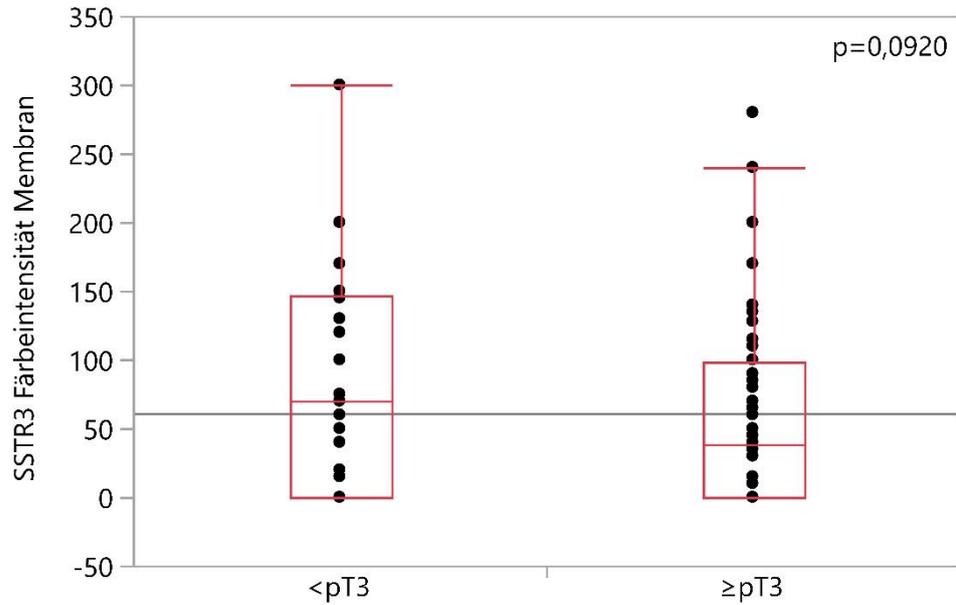


Abb. 30: Korrelation der membranständigen SSTR3-Expression mit dem T-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,0920$.

Auch bei der zytoplasmatischen SSTR3-Expression in Tumorgewebe konnte eine solche Tendenz festgestellt werden. Bei stärkerer Tiefeninfiltration des Tumors wurde weniger SSTR3 im Zytoplasma exprimiert ($p=0,0823$).

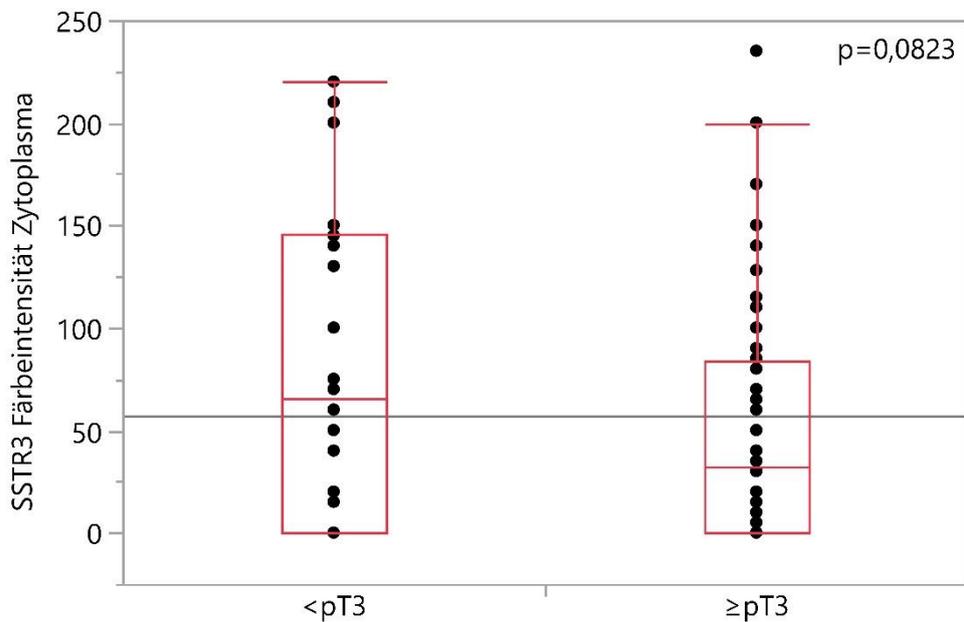


Abb. 31: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR3-Expression mit dem T-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,0823$.

Ergebnisse

3.2.3.4.2 N-Stadium

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von SSTR3 in Membranen und Zytoplasma des Tumors und dem Lymphknotenstatus der Patienten gezeigt werden.

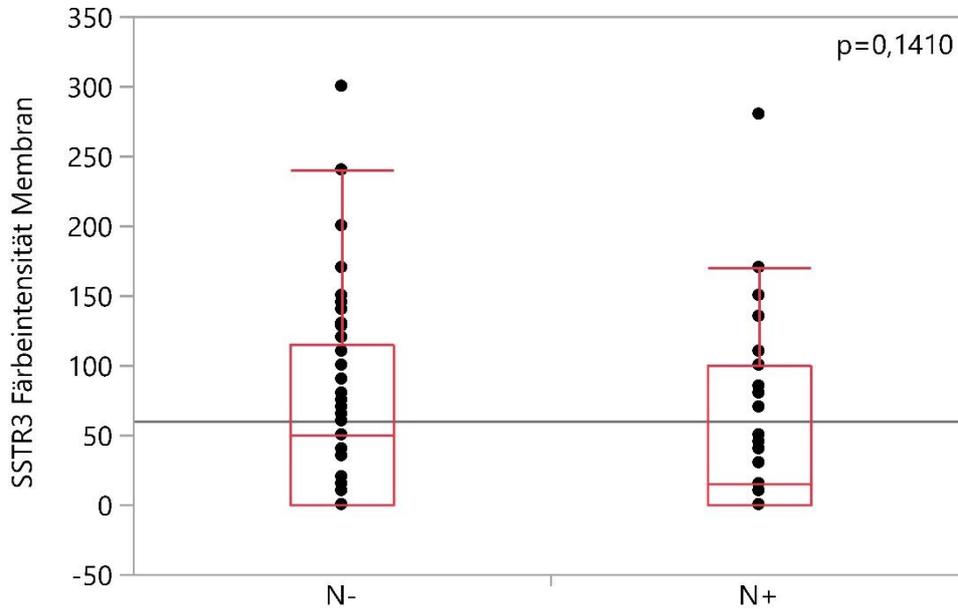


Abb. 32: Korrelation der membranständigen SSTR3-Expression mit dem N-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,1410$.

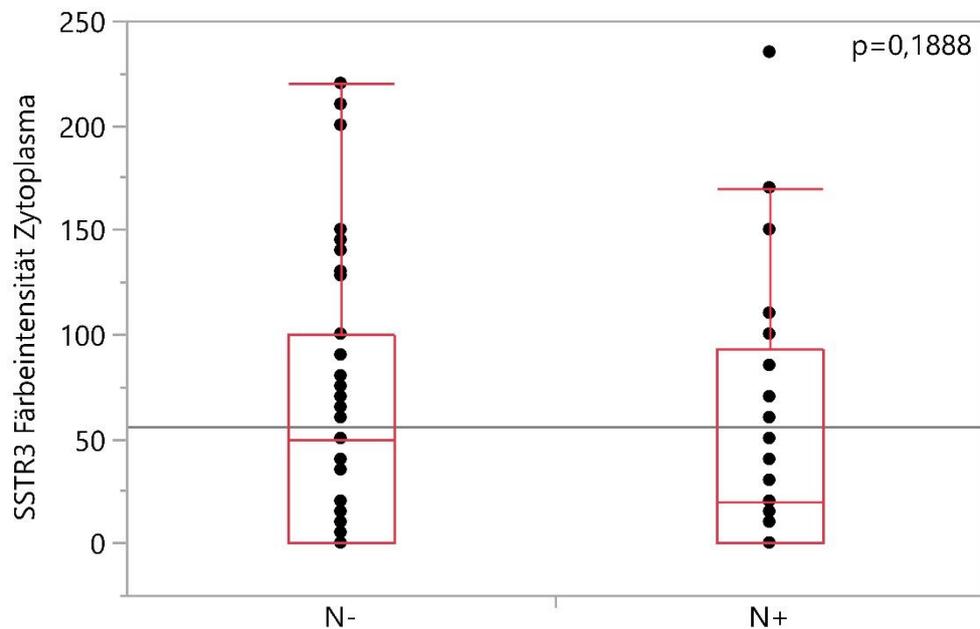


Abb. 33: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR3-Expression mit dem N-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,1888$.

Ergebnisse

3.2.3.4.3 M-Stadium

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der membranösen und zytoplasmatischen Expression von SSTR3 und dem Ausmaß der Fernmetastasierung festgestellt werden.

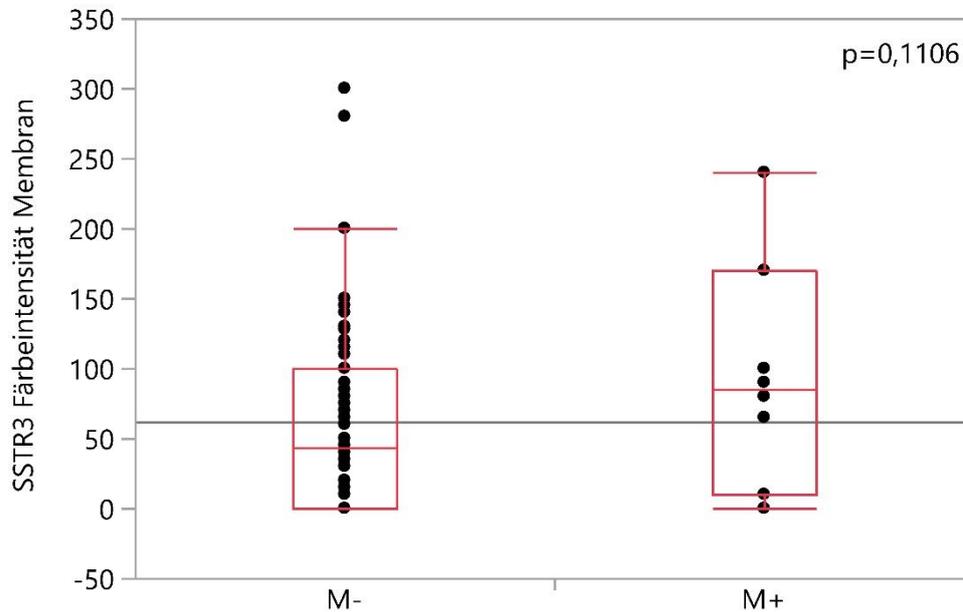


Abb. 34: Korrelation der membranständigen SSTR3-Expression mit dem M-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,1106$.

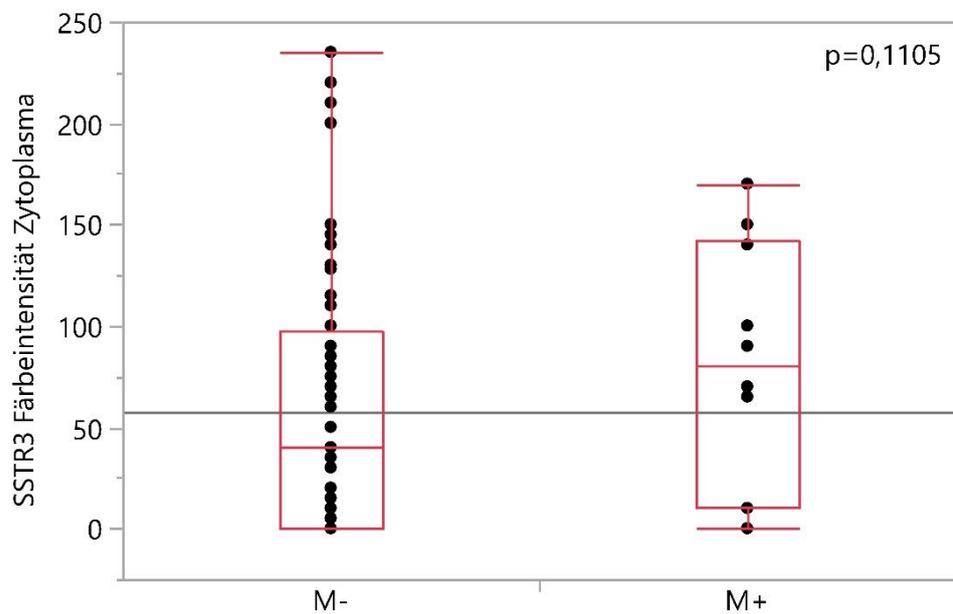


Abb. 35: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR3-Expression mit dem M-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,1105$.

3.2.3.4.4 Grading

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der membranösen und zytoplasmatischen Expression von SSTR3 und dem Grading festgestellt werden.

Ergebnisse

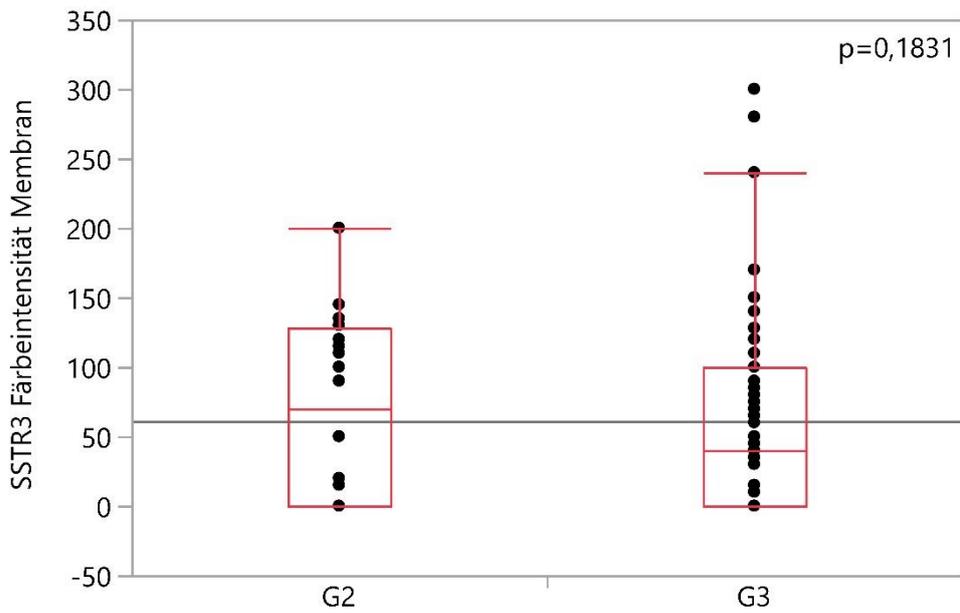


Abb. 36: Korrelation der membranständigen SSTR3-Expression mit dem Grading; Wilcoxon-Test; $p=0,1831$.

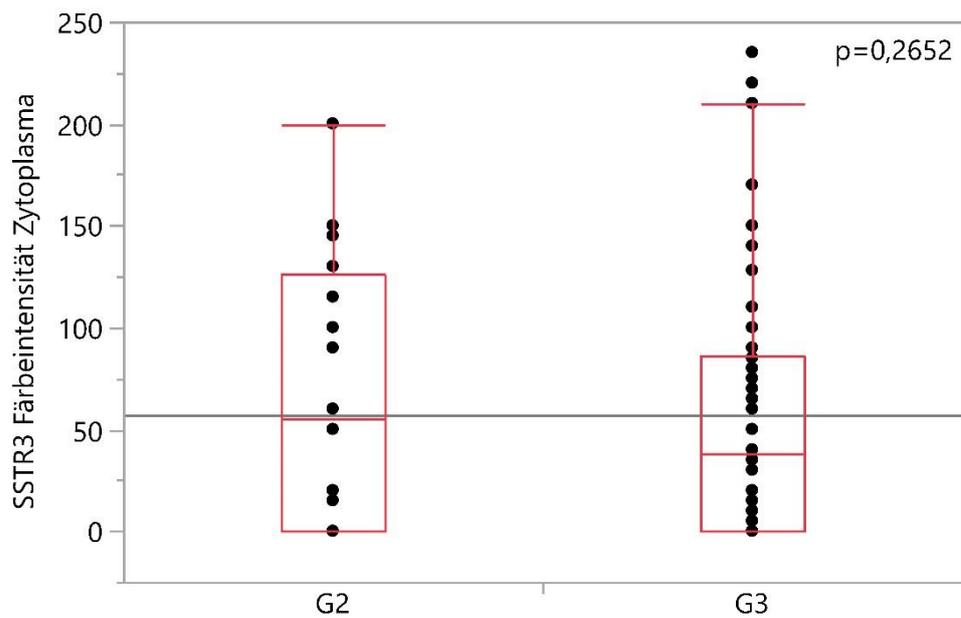


Abb. 37: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR3-Expression mit dem Grading; Wilcoxon-Test; $p=0,2652$.

3.2.4 SSTR4

Die Expression des SSTR-Subtyp 4 zeigte eine weitestgehend homogene Färbung der Membranen. Dagegen zeigte sich eine eher heterogene Färbung des Zytoplasmas, auch hier weitestgehend unter Aussparung der Zellkerne. Eine rein nukleäre Färbung wurde nicht beobachtet und soll im Folgenden auch nicht in die Wertung einfließen.

Es konnte jeweils zwischen Geweben mit geringer, mäßiger und starker membranständiger und zytoplasmatischer Expression unterschieden werden (s. Abb. 38).

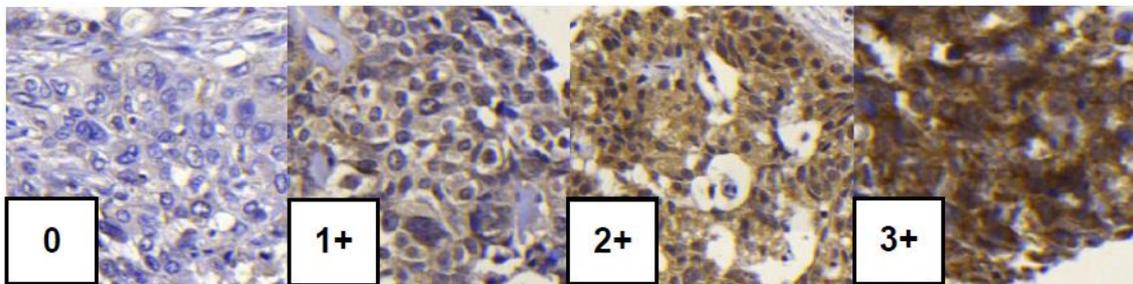


Abb. 38: Färbung gegen SSTR4, Braunfärbung der Zellen. Vergrößerung 1:400, Tumorgewebe. Jeweils homogene Färbung von Zytoplasma und Membran unter Aussparung des Zellkerns.

Es folgt die statistische Auswertung der erhobenen Ergebnisse.

3.2.4.1 Statistische Kenngrößen

In den Membranen des Normalgewebes ergaben sich Werte zwischen 0 und 300 (Median 200, Mittelwert 216,5, SD 59,7), im Zytoplasma zwischen 80 und 235 (Median 160, Mittelwert 158,6, SD 36,8).

Die Auswertung der membranösen SSTR4-Expression im Tumorgewebe ergab Werte zwischen 0 und 300 (Median 200, Mittelwert 187,9, SD 65,3). Im Zytoplasma des Tumorgewebes zeigten sich Werte des H-Scores von 0 bis 290 (Median 180, Mittelwert 170,8, SD 58,5).

3.2.4.2 Vergleich der membranösen Expression in Normal- und Tumorgewebe

Beim Vergleich der SSTR4-Expression in Membranen von Normal- und Tumorgewebe ergab sich mit $p=0,0137$ ein signifikantes Ergebnis. In den Membranen des Normalgewebes wurden mehr SSTR4 exprimiert als in Membranen des Tumorgewebes.

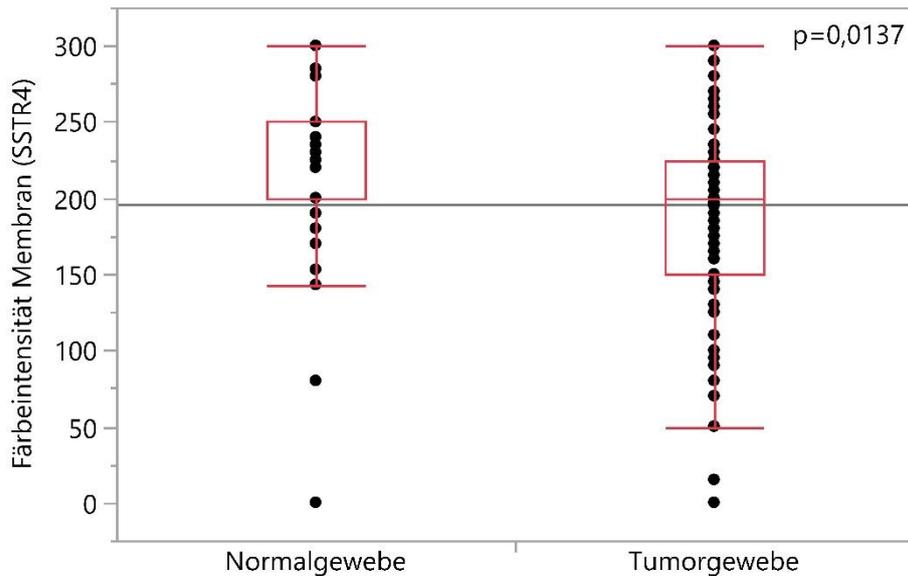


Abb. 39: Vergleich der membranösen Expression von SSTR4 in Normal- und Tumorgewebe, H-Score, einfaktorielles Analyse (Wilcoxon Test, $p=0,0137$).

3.2.4.3 Vergleich der zytoplasmatischen Expression in Normal- und Tumorgewebe

Der Vergleich der zytoplasmatischen SSTR4-Expression in Normal- und Tumorgewebe ergab keinen signifikanten Unterschied (s. Abb. 40).

Ergebnisse

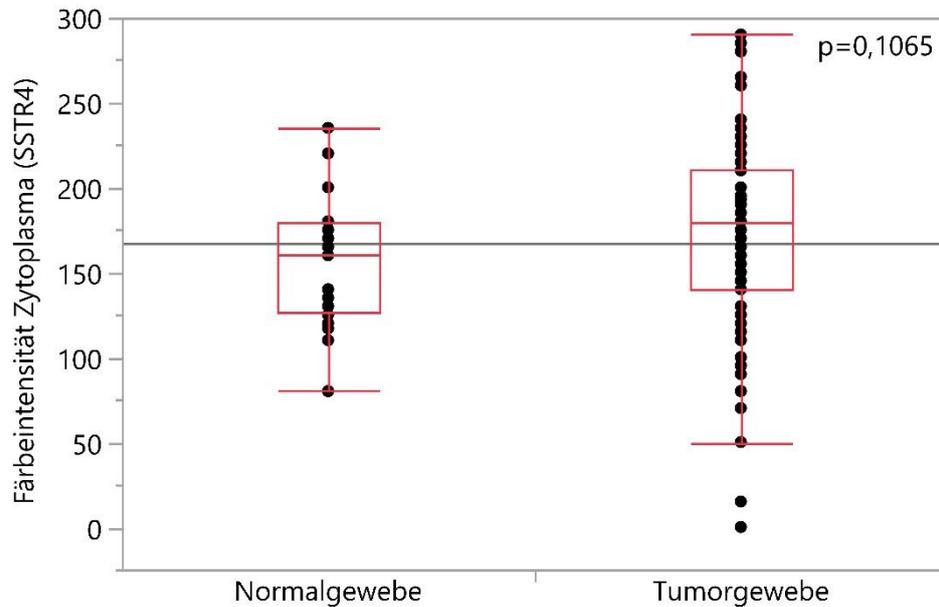


Abb. 40: Vergleich der zytoplasmatischen Expression von SSTR4 in Normal- und Tumorgewebe, H-Score, einfaktorielles Analyse (Wilcoxon Test, $p=0,1065$).

3.2.4.4 Korrelation mit TNM-Klassifikation und Grading

3.2.4.4.1 T-Stadium

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der membranösen und zytoplasmatischen Expression von SSTR4 in Tumorgewebe und dem T-Stadium festgestellt werden.

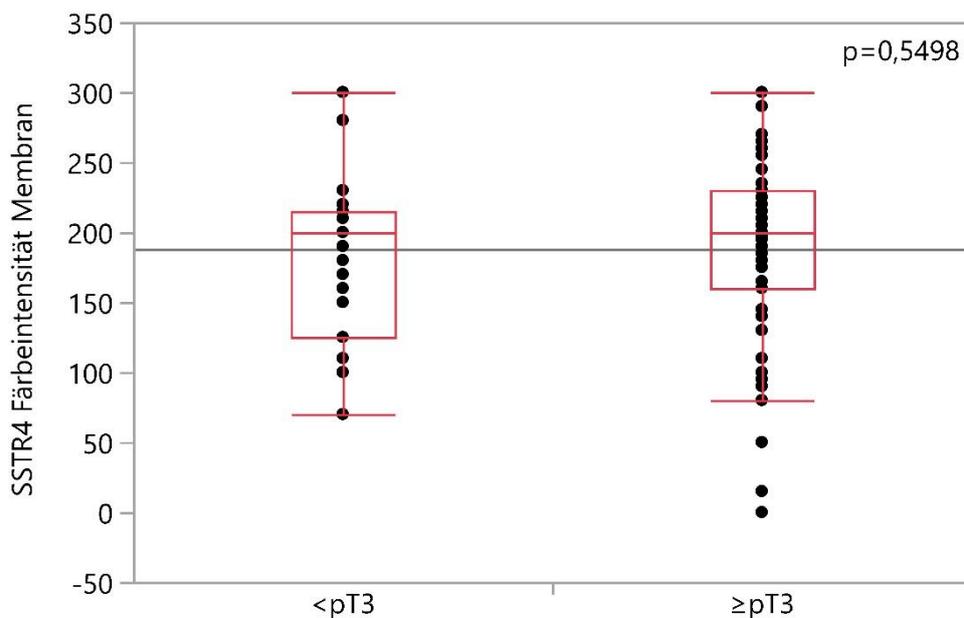


Abb. 41: Korrelation der membranständigen SSTR4-Expression mit dem T-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,5498$.

Ergebnisse

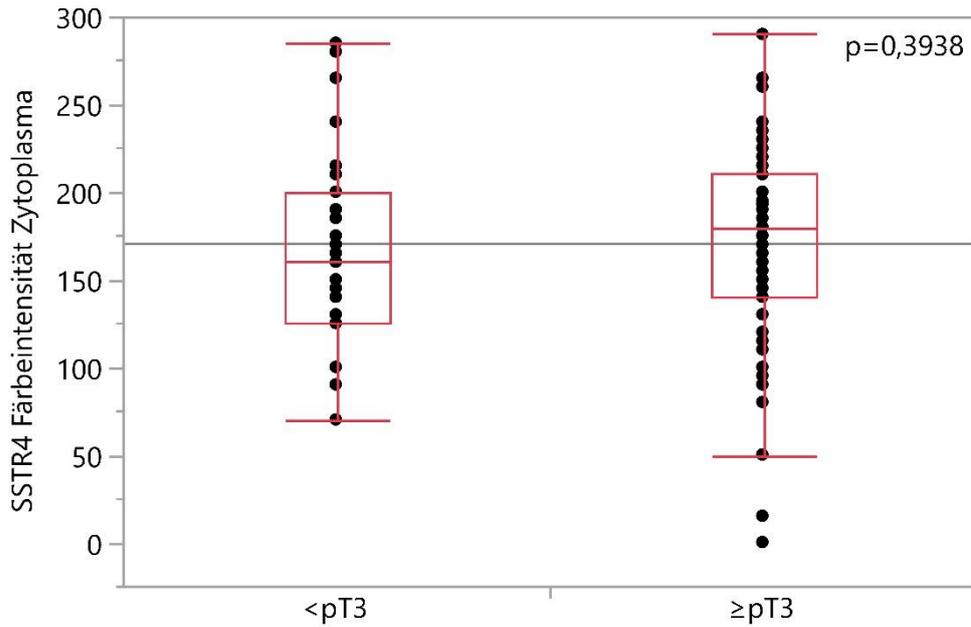


Abb. 42: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR4-Expression mit dem T-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,3938$.

3.2.4.4.2 N-Stadium

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der SSTR4-Expression in Membranen und Zytoplasma des Tumorgewebes und dem N-Stadium der Patienten festgestellt werden.

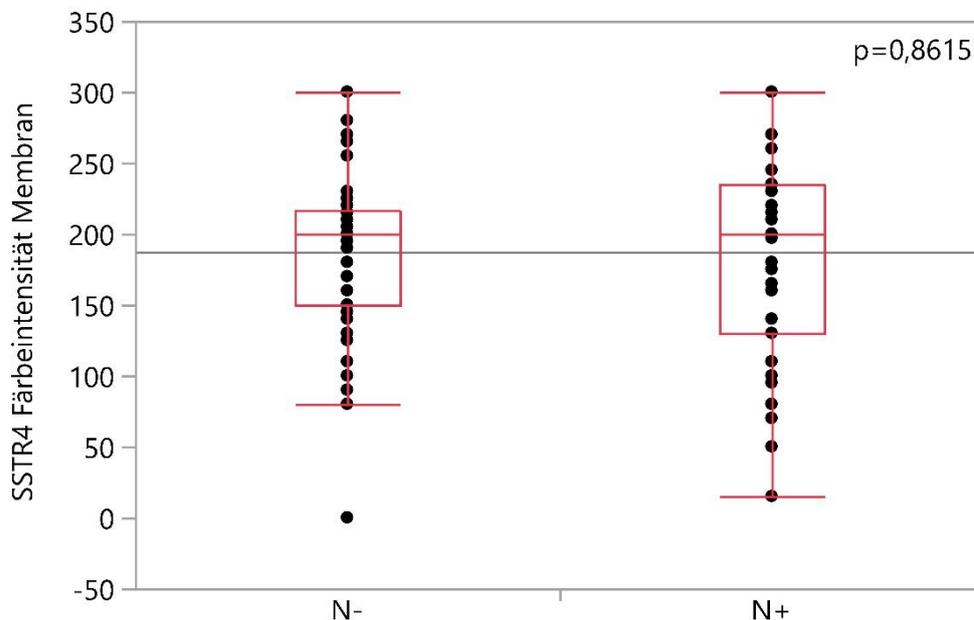


Abb. 43: Korrelation der membranständigen SSTR4-Expression mit dem N-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,8615$.

Ergebnisse

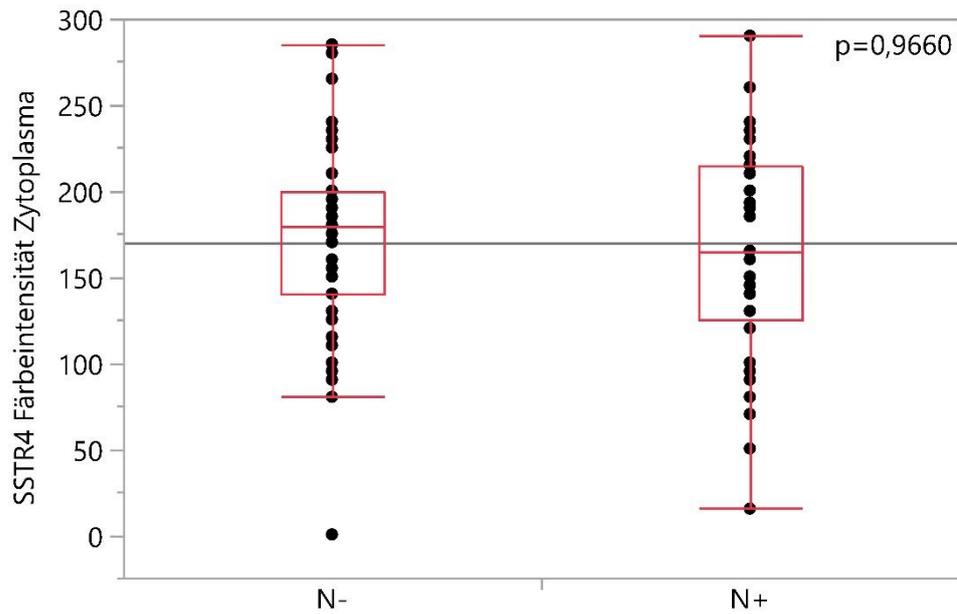


Abb. 44: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR4-Expression mit dem N-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,9660$.

3.2.4.4.3 M-Stadium

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der SSTR4-Expression in Membranen und Zytoplasma des Tumorgewebes und dem M-Stadium der Patienten festgestellt werden.

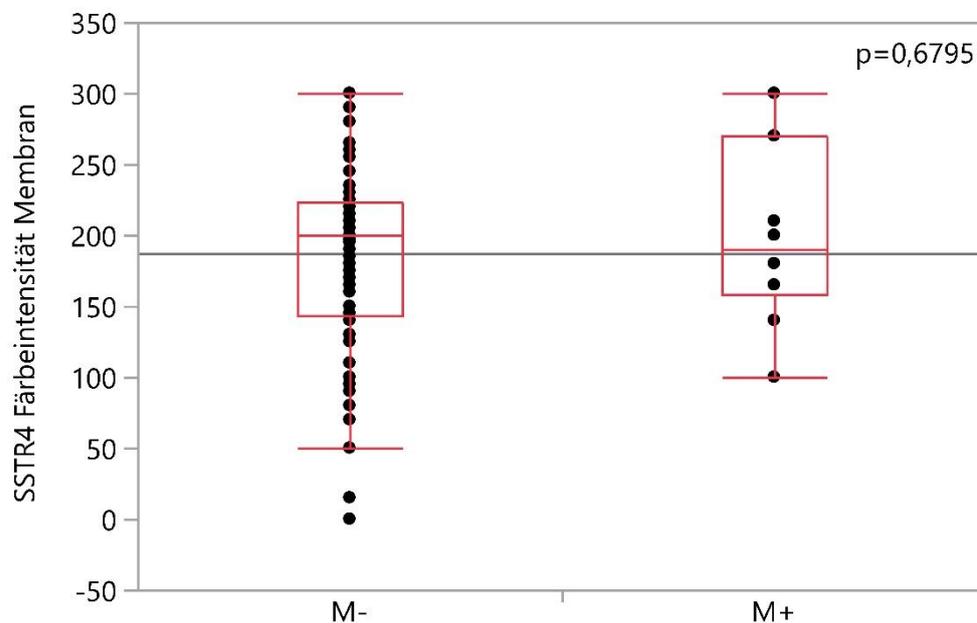


Abb. 45: Korrelation der membranständigen SSTR4-Expression mit dem M-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,6795$.

Ergebnisse

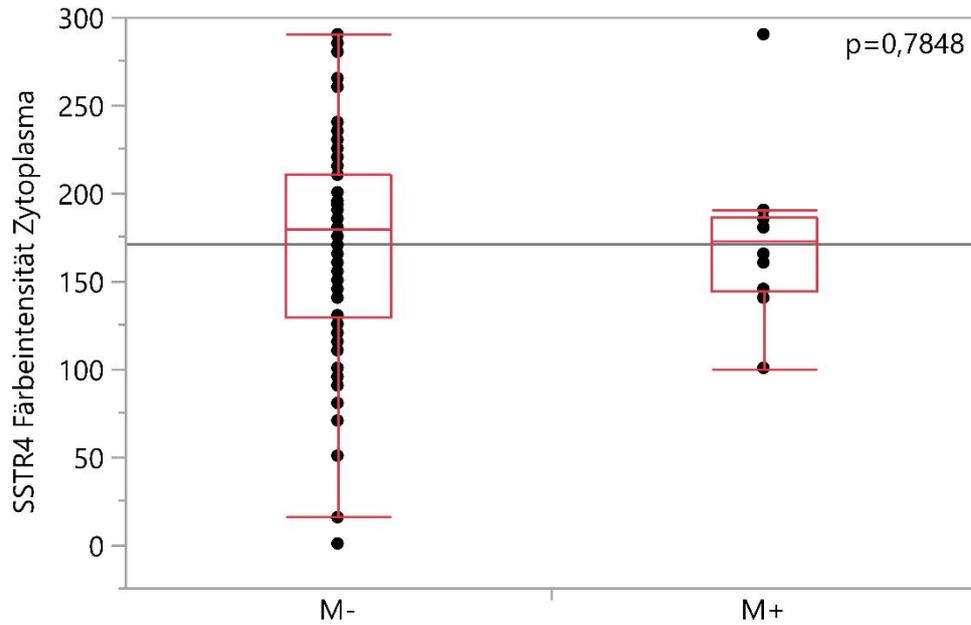


Abb. 46: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR4-Expression mit dem M-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,7848$.

3.2.4.4.4 Grading

Für membranständige SSTR4-Expression in Tumorgewebe ließ sich die minimale Tendenz zur verstärkten Expression bei schlecht differenzierten Tumoren nachweisen ($p=0,0974$).

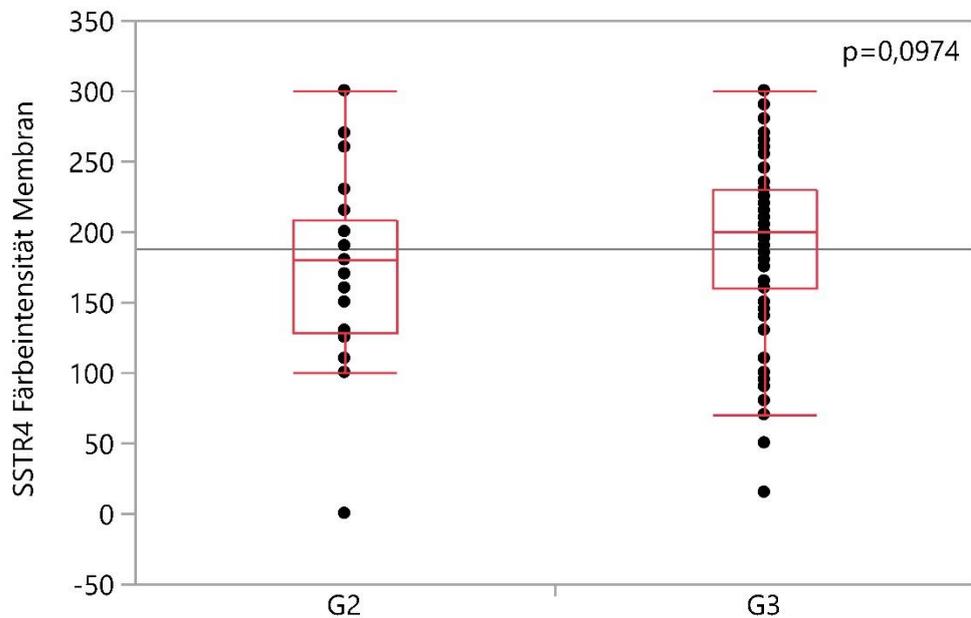


Abb. 47: Korrelation der membranständigen SSTR4-Expression mit dem Grading; Wilcoxon-Test; $p=0,0974$.

Ergebnisse

Auch für die zytoplasmatische SSTR4-Expression konnte die leichte Tendenz festgestellt werden, dass histologisch schlechter differenzierte Tumore (G3) im Vergleich zu G2-Tumoren mehr zytoplasmatische SSTR4 exprimieren ($p=0,0825$).

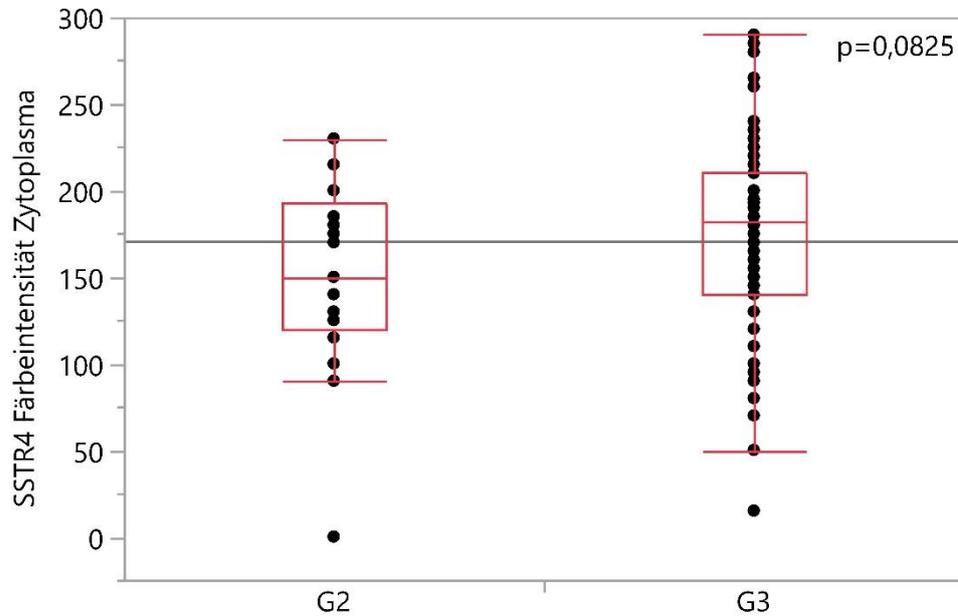


Abb. 48: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR4-Expression mit dem Grading; Wilcoxon-Test; $p=0,0825$.

3.2.5 SSTR5

Es konnten Färbungen der Membran und des Zytoplasmas festgestellt werden. Die membranständige Expression verteilte sich wie schon bei den vorherigen Subtypen eher homogen über das Urothelgewebe. Die zytoplasmatische Färbung des SSTR5 zeigte sich heterogen in verschiedenen Brauntönen und insgesamt sehr intensiv (s. Abb. 49).

Einzelne benigne Gewebedots zeigten an der luminalen Seite des Urothels einzelne Zellen, die weder eine zytoplasmatische noch eine membranständige Färbung aufwiesen.

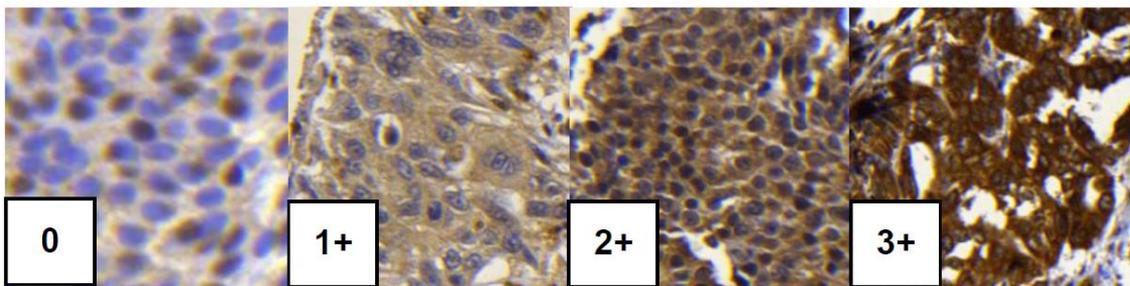


Abb. 49: Färbung gegen SSTR5, Braunfärbung der Zellen, Score 0-3. Vergrößerung 1:400, 0 benignes Gewebe, 1+ bis 3+ Tumorgewebe. Jeweils homogene Färbung von Zytoplasma und Membran, vereinzelt nukleäre Färbung.

3.2.5.1 Statistische Kenngrößen

In den Membranen des Normalgewebes ergaben sich Werte zwischen 70 und 300 (Median 170, Mittelwert 167,6, SD 61,8). Im Zytoplasma des Normalgewebes zeigten sich für den H-Score ebenfalls Werte zwischen 70 und 300 (Median 135, Mittelwert 142,3, SD 54,8).

In der membranständigen SSTR5-Expression des Tumorgewebes ergaben sich Scores zwischen 45 und 300 (Median 200, Mittelwert 206,3, SD 67,4). Auch im Zytoplasma des Tumorgewebes ergaben sich Werte zwischen 45 und 300 (Median 180, Mittelwert 186,4, SD 60,1).

3.2.5.2 Vergleich der membranösen Expression in Normal- und Tumorgewebe

Der Vergleich von SSTR5 in den Membranen von Normal- und Tumorgewebe ergab mit $p=0,0017$ ein signifikantes Ergebnis (siehe Abb. 50). In den

Ergebnisse

Membranen des Tumorgewebes wurden mehr SSTR5 exprimiert als in Membranen des Normalgewebes.

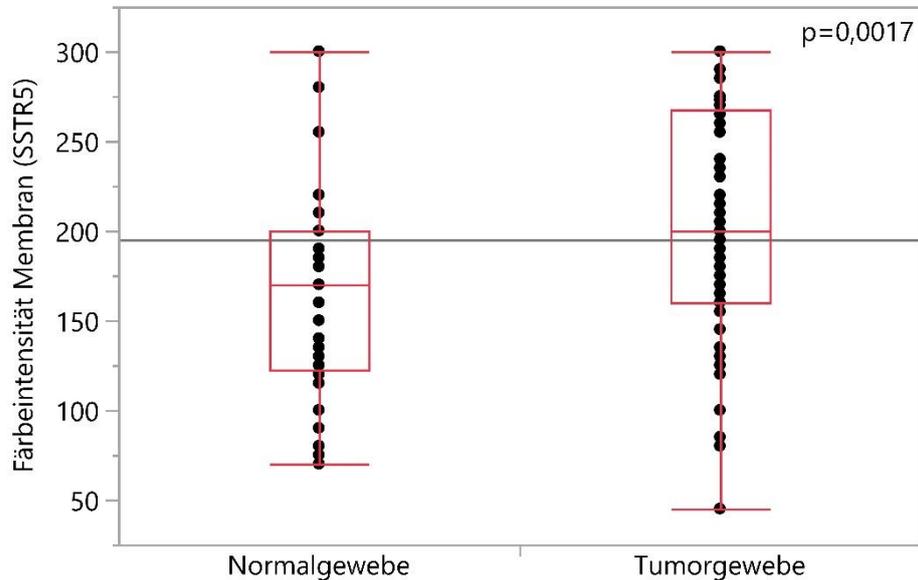


Abb. 50: Vergleich der membranösen Expression von SSTR5 in Normal- und Tumorgewebe, H-Score, einfaktorielles Analyse (Wilcoxon Test, $p=0,0017$).

3.2.5.3 Vergleich der zytoplasmatischen Expression in Normal- und Tumorgewebe

Beim Vergleich der SSTR5-Expression im Zytoplasma von Normal- und Tumorgewebe ergab sich mit $p<0,0001$ ein signifikantes Ergebnis. Im Zytoplasma des Tumorgewebes wurde mehr SSTR5 exprimiert als im Zytoplasma des Normalgewebes (siehe Abb. 51).

Ergebnisse

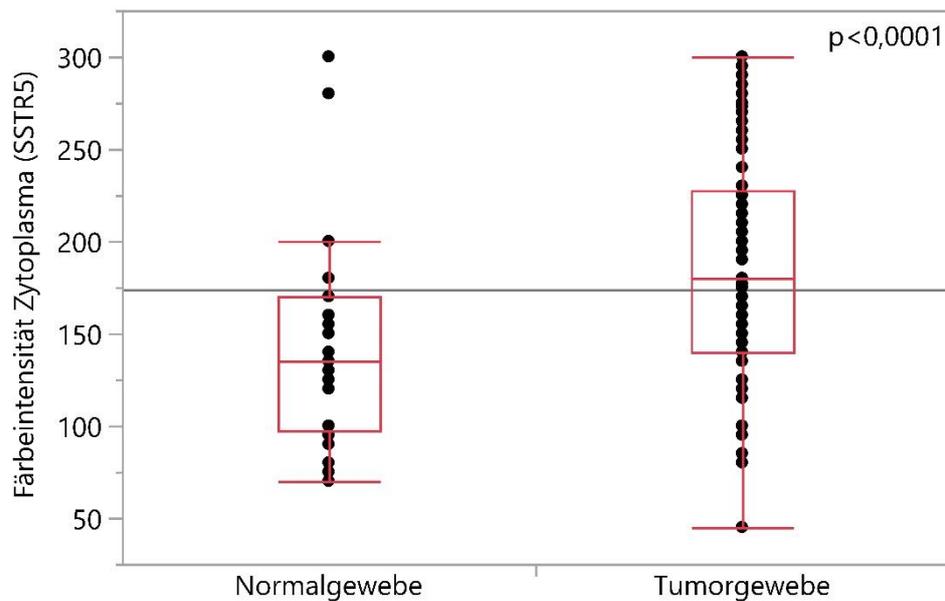


Abb. 51: Vergleich der zytoplasmatischen Expression von SSTR5 in Normal- und Tumorgewebe, H-Score, einfaktorische Analyse (Wilcoxon Test, $p < 0,0001$).

3.2.5.4 Korrelation mit TNM-Klassifikation und Grading

3.2.5.4.1 T-Stadium

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der membranösen und zytoplasmatischen Expression von SSTR5 in Tumorgewebe und dem T-Stadium festgestellt werden (s. Abb. 52).

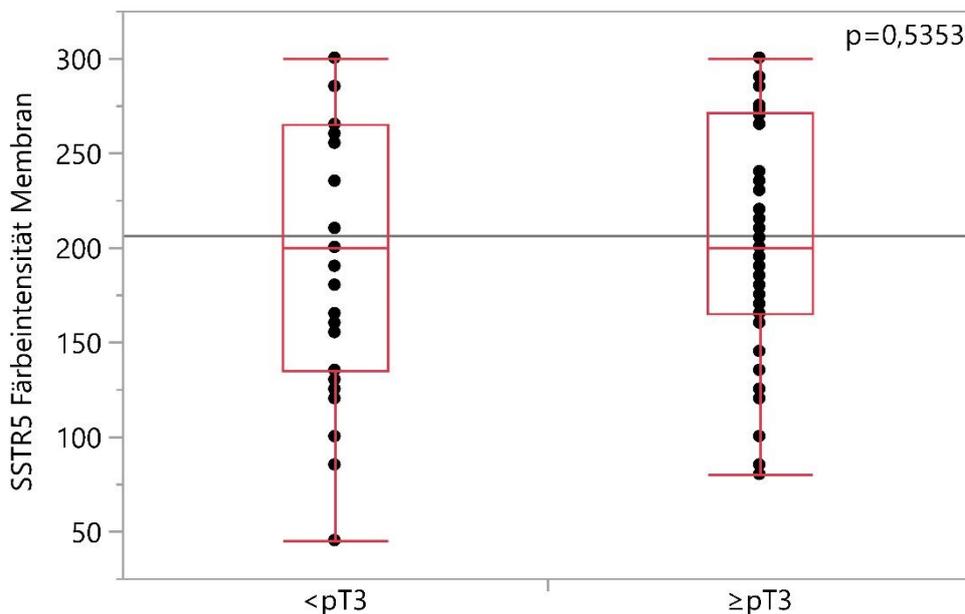


Abb. 52: Korrelation der membranständigen SSTR5-Expression mit dem T-Stadium; Wilcoxon-Test; $p = 0,5353$.

Ergebnisse

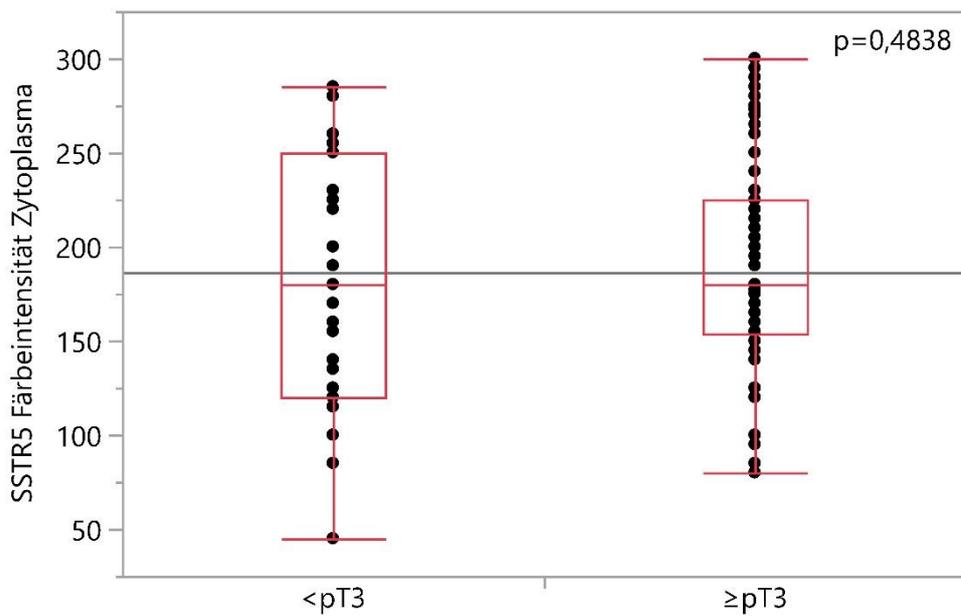


Abb. 53: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR5-Expression mit dem T-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,4838$.

3.2.5.4.2 N-Stadium

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der membranösen und zytoplasmatischen Expression von SSTR5 in Tumorgewebe und dem N-Stadium festgestellt werden.

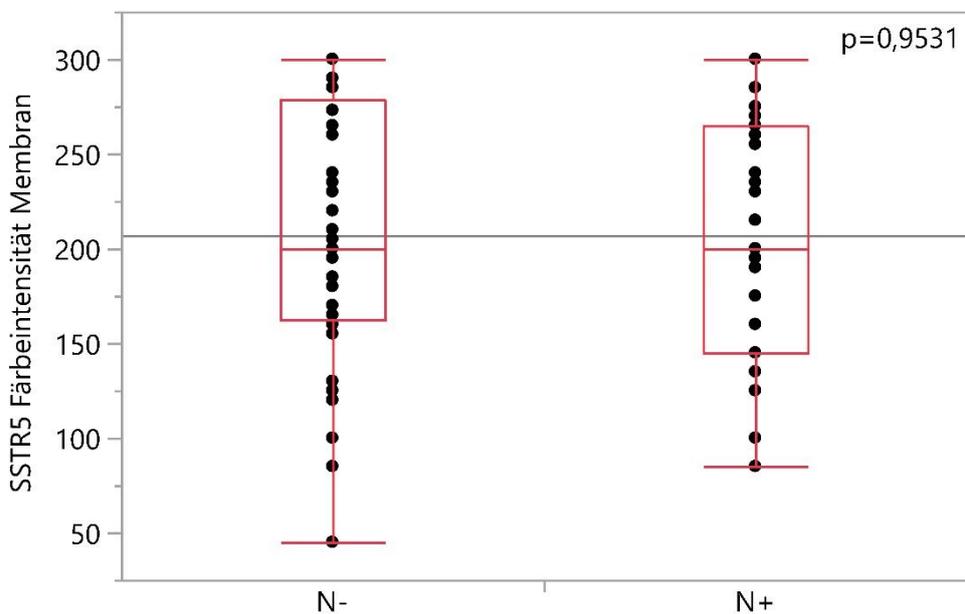


Abb. 54: Korrelation der membranständigen SSTR5-Expression mit dem N-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,9531$.

Ergebnisse

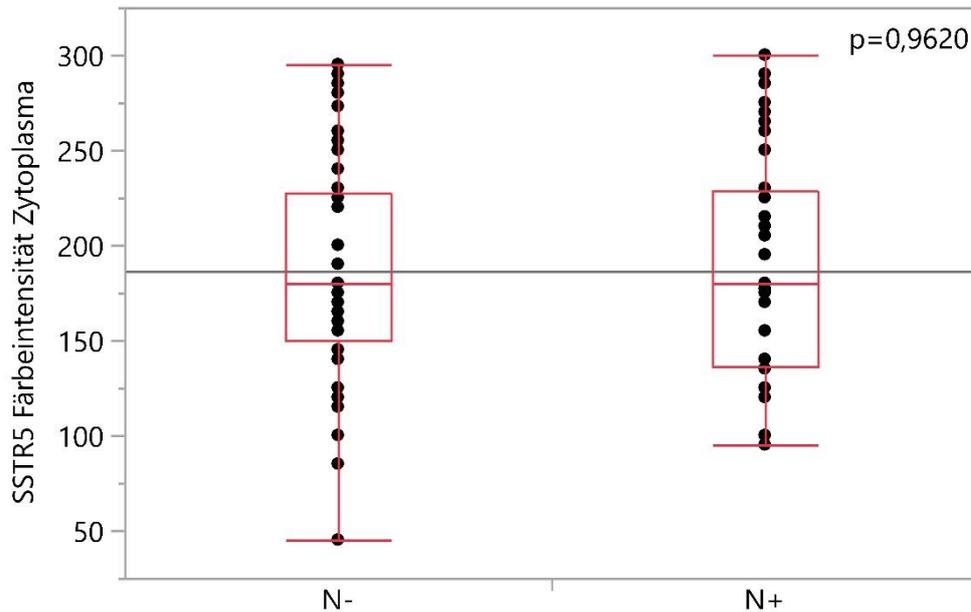


Abb. 55: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR5-Expression mit dem N-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,9620$.

3.2.5.4.3 M-Stadium

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der membranösen und zytoplasmatischen Expression von SSTR5 in Tumorgewebe und dem M-Stadium festgestellt werden (s. Abb. 56 und 57).

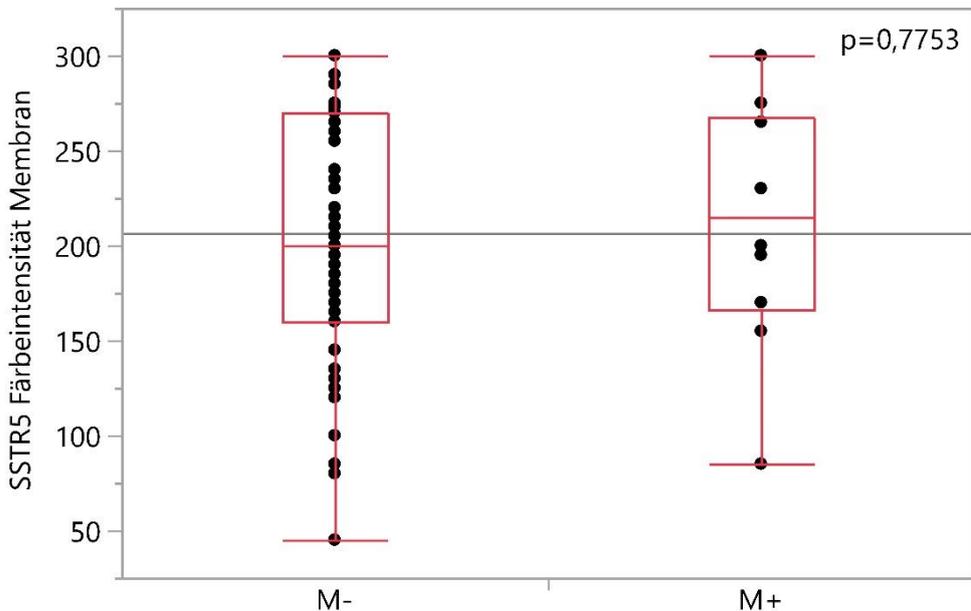


Abb. 56: Korrelation der membranständigen SSTR5-Expression mit dem M-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,7753$.

Ergebnisse

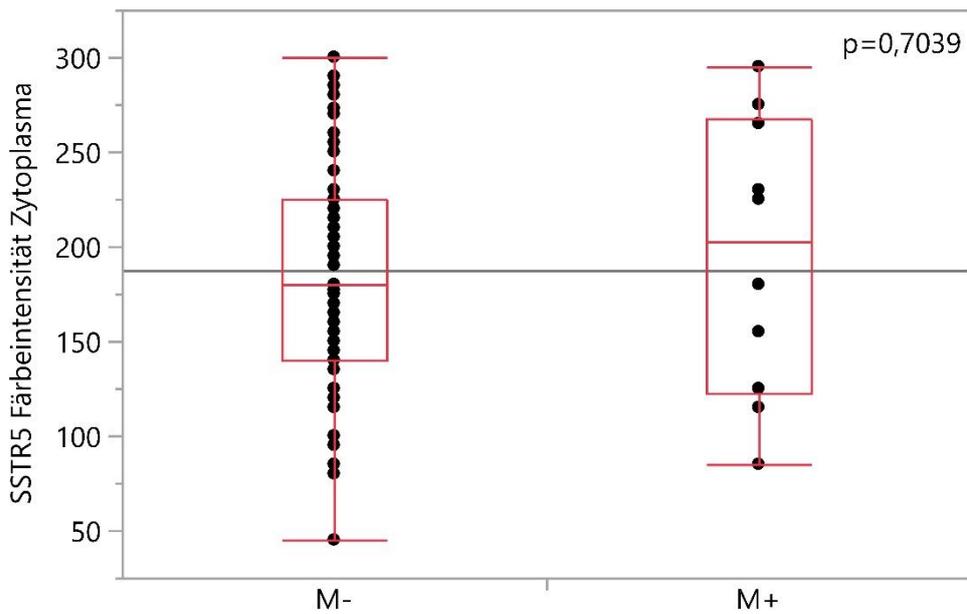


Abb. 57: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR5-Expression mit dem M-Stadium; Wilcoxon-Test; $p=0,7039$.

3.2.5.4.4 Grading

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der membranösen und zytoplasmatischen Expression von SSTR5 in Tumorgewebe und dem Grading festgestellt werden (s. Abb. 58 und 59).

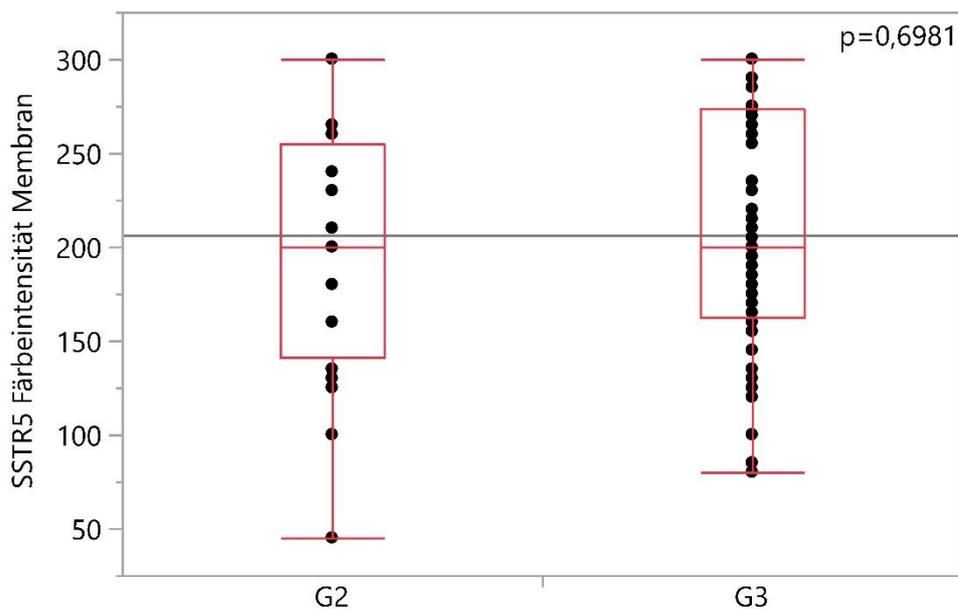


Abb. 58: Korrelation der membranständigen SSTR5-Expression mit dem Grading; Wilcoxon-Test; $p=0,6981$.

Ergebnisse

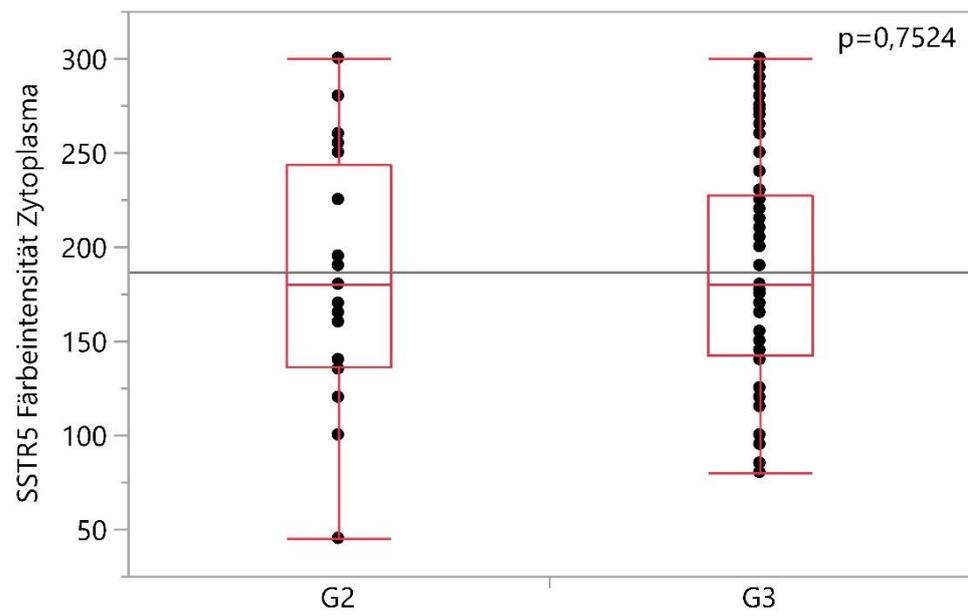


Abb. 59: Korrelation der zytoplasmatischen SSTR5-Expression mit dem Grading; Wilcoxon-Test; $p=0,7524$.

3.2.6 Interaktion der SSTR-Subtypen in Tumorgewebe

Es wurde untersucht, inwiefern die Expression der jeweiligen SSTR-Subtypen in Tumorgewebe miteinander korreliert. Dafür wurden abermals die Mittelwerte der bestimmten H-Scores verwendet.

3.2.6.1 Membranständige SSTR

Es konnte festgestellt werden, dass der SSTR-Subtyp 1 positiv mit den Subtypen 2-5 korreliert. Je höher die Expression von SSTR1, desto höher auch die Expression von SSTR2 ($p=0,0069$), SSTR3 ($p=0,0001$), SSTR4 ($p=0,0001$) und SSTR5 ($p=0,0012$).

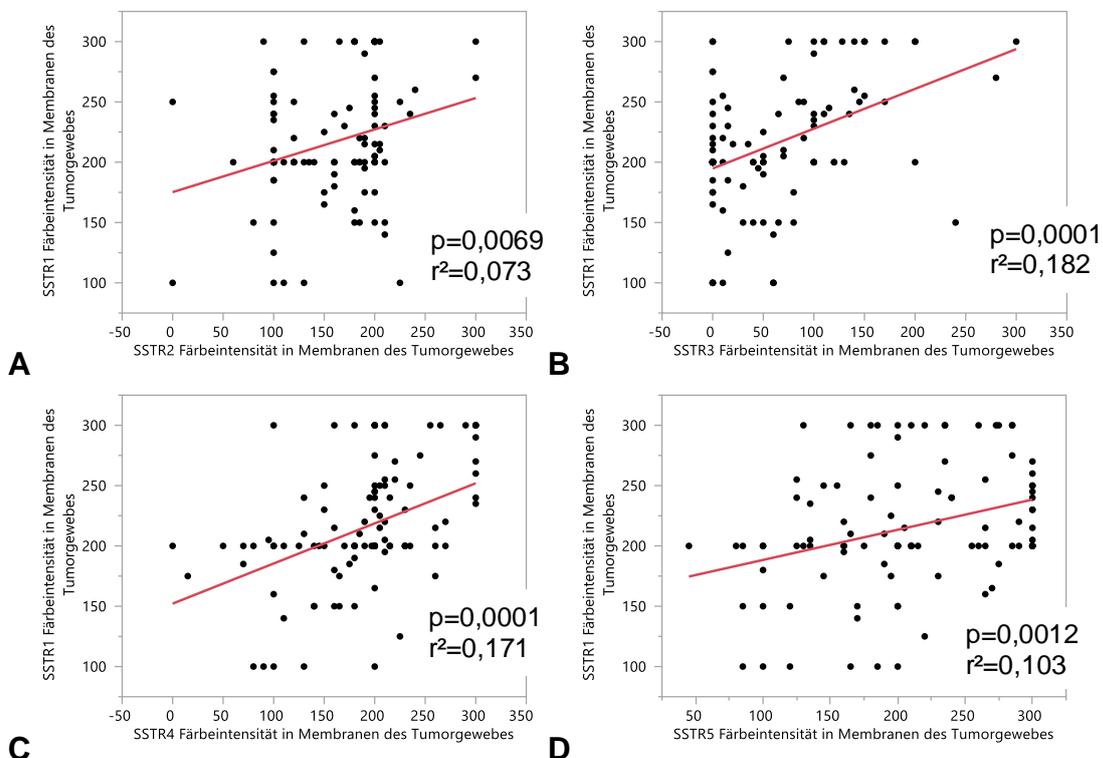


Abb. 60: Korrelation der SSTR1 Färbeintensität mit der Färbeintensität von **(A)** SSTR2 ($p=0,0069$), **(B)** SSTR3 ($p=0,0001$), **(C)** SSTR4 ($p=0,0001$) und **(D)** SSTR5 ($p=0,0012$). Jeweils membranständige Färbung, lineare Regressionsanalyse.

Auch für den Vergleich der Expression des Subtypen 2 mit SSTR3 ergab sich mit $p<0,0001$ ein signifikantes Ergebnis. Je mehr SSTR2 exprimiert wurde, desto mehr SSTR3 wurde auch exprimiert (siehe Abb. 61). Die Prüfung der Korrelation von SSTR2 mit den Subtypen 4 und 5 ergab kein signifikantes Ergebnis.

Ergebnisse

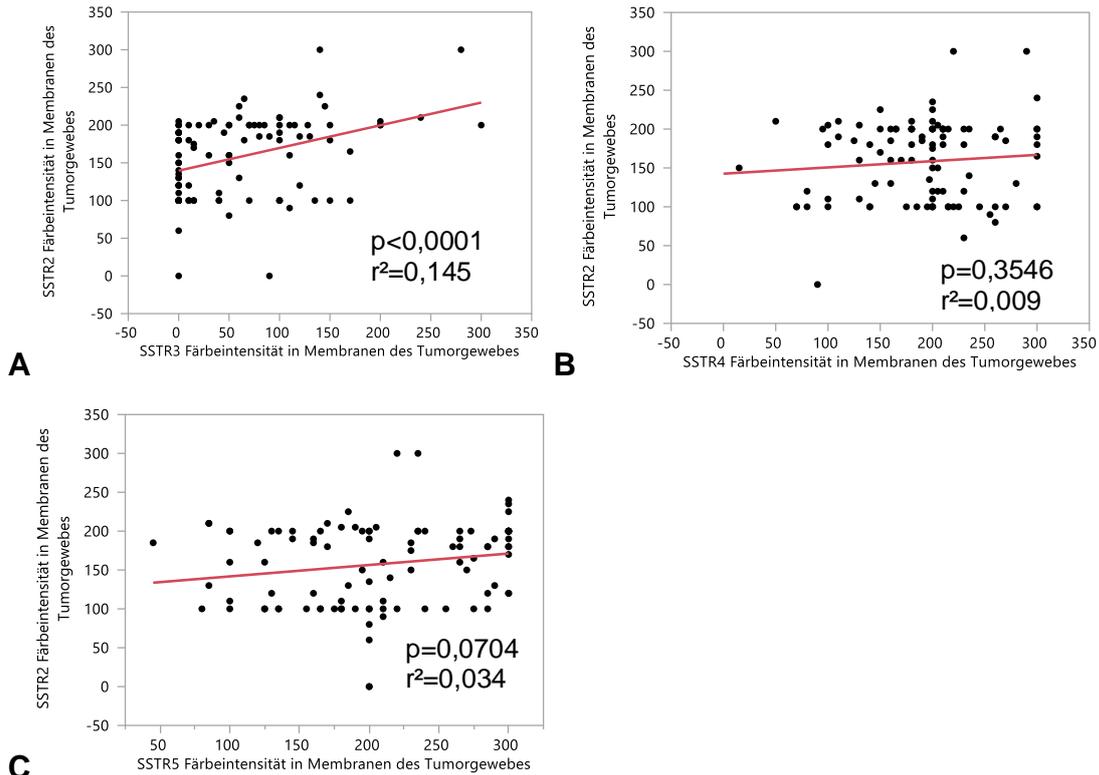


Abb. 61: Korrelation der SSTR2 Färbintensität mit der Färbintensität von **(A)** SSTR3 ($p < 0,0001$), **(B)** SSTR4 ($p = 0,3546$) und **(C)** SSTR5 ($p = 0,0704$). Jeweils membranständige Färbung, lineare Regressionsanalyse.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Subtypen 3 und 4 positiv miteinander korrelieren ($p = 0,0036$, siehe Abb. 62A). Für die Subtypen 3 und 5 ergab sich die Tendenz ($p = 0,065$), dass bei steigender SSTR5-Expression die Anzahl der SSTR3-Rezeptoren sank (s. Abb. 62B).

Die SSTR-Subtypen 4 und 5 korrelierten nicht signifikant miteinander (s. Abb. 63).

Ergebnisse

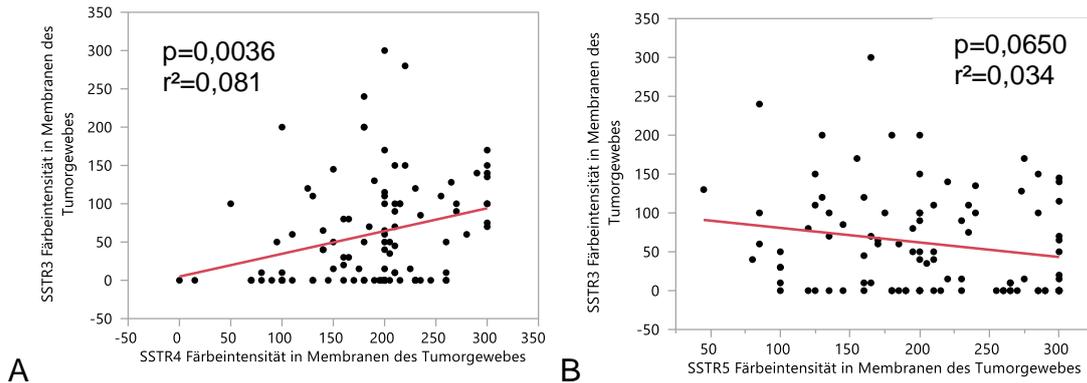


Abb. 62: Korrelation der SSTR3 Färbeintensität mit der Färbeintensität von **(A)** SSTR4 ($p=0,0036$) und **(B)** SSTR5 ($p=0,0650$). Jeweils membranständige Färbung, lineare Regressionsanalyse.

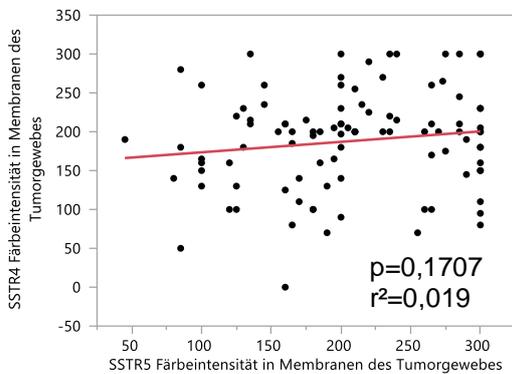


Abb. 63: Korrelation der SSTR4 Färbeintensität mit der Färbeintensität von SSTR5 ($p=0,1707$). Jeweils membranständige Färbung, lineare Regressionsanalyse.

3.2.6.2 Zytoplasmatische SSTR

Es konnte festgestellt werden, dass der SSTR-Subtyp 1 positiv mit den Subtypen 2-5 korreliert. Je höher die Expression von SSTR1, desto höher auch die Expression von SSTR2 ($p=0,0001$), SSTR3 ($p=0,0001$), SSTR4 ($p=0,0001$), SSTR5 ($p=0,0002$, s. Abb. 64).

Ergebnisse

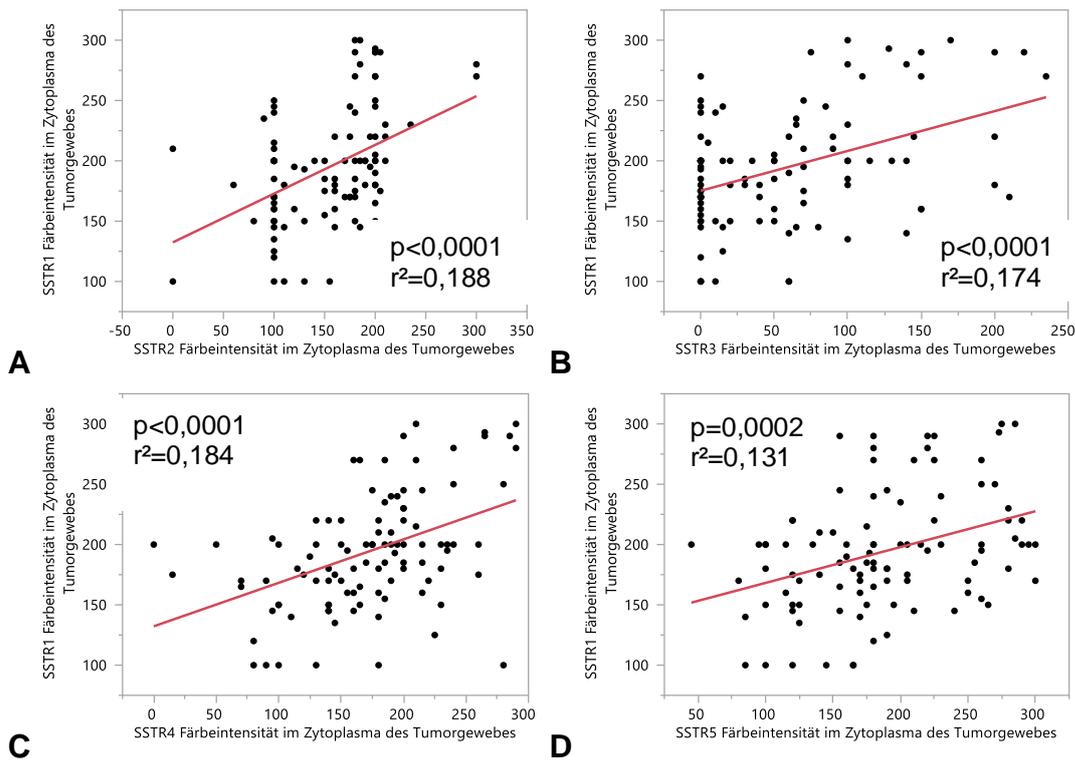
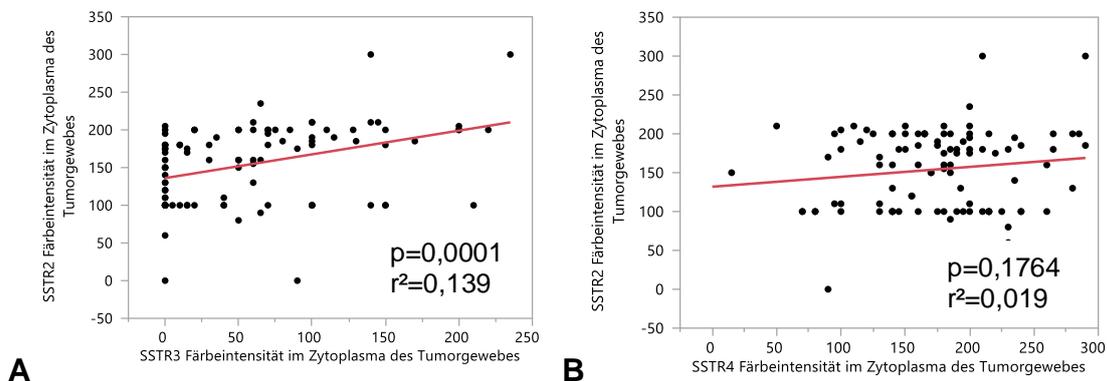
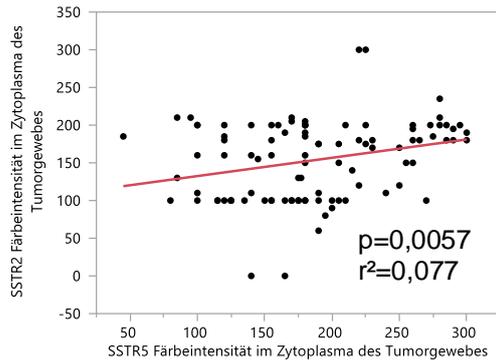


Abb. 64: Korrelation der SSTR1 Färbeintensität mit der Färbeintensität von **(A)** SSTR2 ($p < 0,0001$), **(B)** SSTR3 ($p < 0,0001$), **(C)** SSTR4 ($p < 0,0001$) und **(D)** SSTR5 ($p = 0,0002$). Jeweils zytoplasmatische Färbung, lineare Regressionsanalyse.

Selbiges galt für SSTR2 mit den Subtypen 3 ($p = 0,0001$) und 5 ($p = 0,0057$): Je mehr SSTR2 exprimiert wurde, desto mehr SSTR3 beziehungsweise SSTR5 wurde exprimiert (siehe Abb. 65). Ein solcher Zusammenhang war für SSTR2 und SSTR4 nicht nachweisbar.



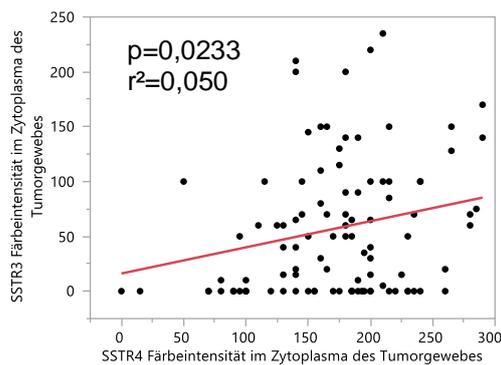
Ergebnisse



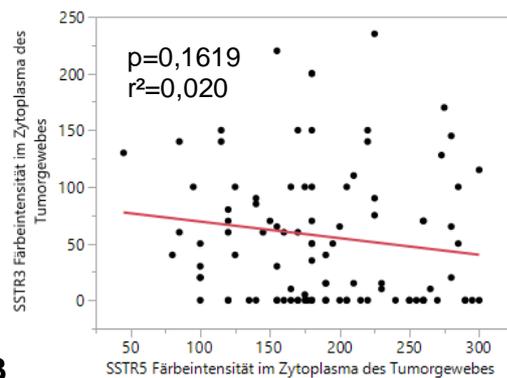
C

Abb. 65: Korrelation der Färbeintensitäten von SSTR2 mit **(A)** SSTR3 ($p=0,0001$), **(B)** SSTR4 ($p=0,1764$) und **(C)** SSTR5 ($p=0,0057$). Jeweils zytoplasmatische Färbung, lineare Regressionsanalyse.

Auch SSTR3 und SSTR4 korrelierten positiv miteinander ($p=0,0233$). Je mehr SSTR3 exprimiert wurde, desto mehr SSTR4 wurde auch exprimiert (siehe Abb. 66). Zwischen SSTR3 und SSTR5 ließ sich kein signifikanter Zusammenhang feststellen.



A



B

Abb. 66: Korrelation der SSTR3 Färbeintensitäten mit **(A)** SSTR4 ($p=0,0233$) und **(B)** SSTR5 ($p=0,1619$). Jeweils zytoplasmatische Färbung, lineare Regressionsanalyse.

Bei SSTR4 und SSTR5 zeigte sich die Tendenz, dass eine vermehrte SSTR4-Expression auch mit einer erhöhten SSTR5-Expression einherging ($p=0,0597$, s. Abb. 67).

Ergebnisse

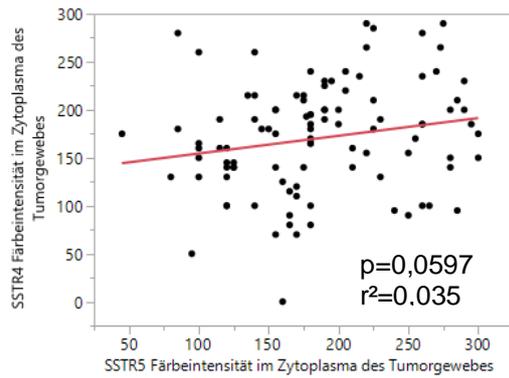


Abb. 67: Korrelation der SSTR4 Färbeintensität mit SSTR5 ($p=0,0597$). Jeweils zytoplasmatische Färbung, lineare Regressionsanalyse.

3.2.7 Korrelation mit demographischen Daten

3.2.7.1 Alter

3.2.7.1.1 SSTR1

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von SSTR1 in Membranen oder Zytoplasma des Tumorgewebes mit dem Patientenalter.

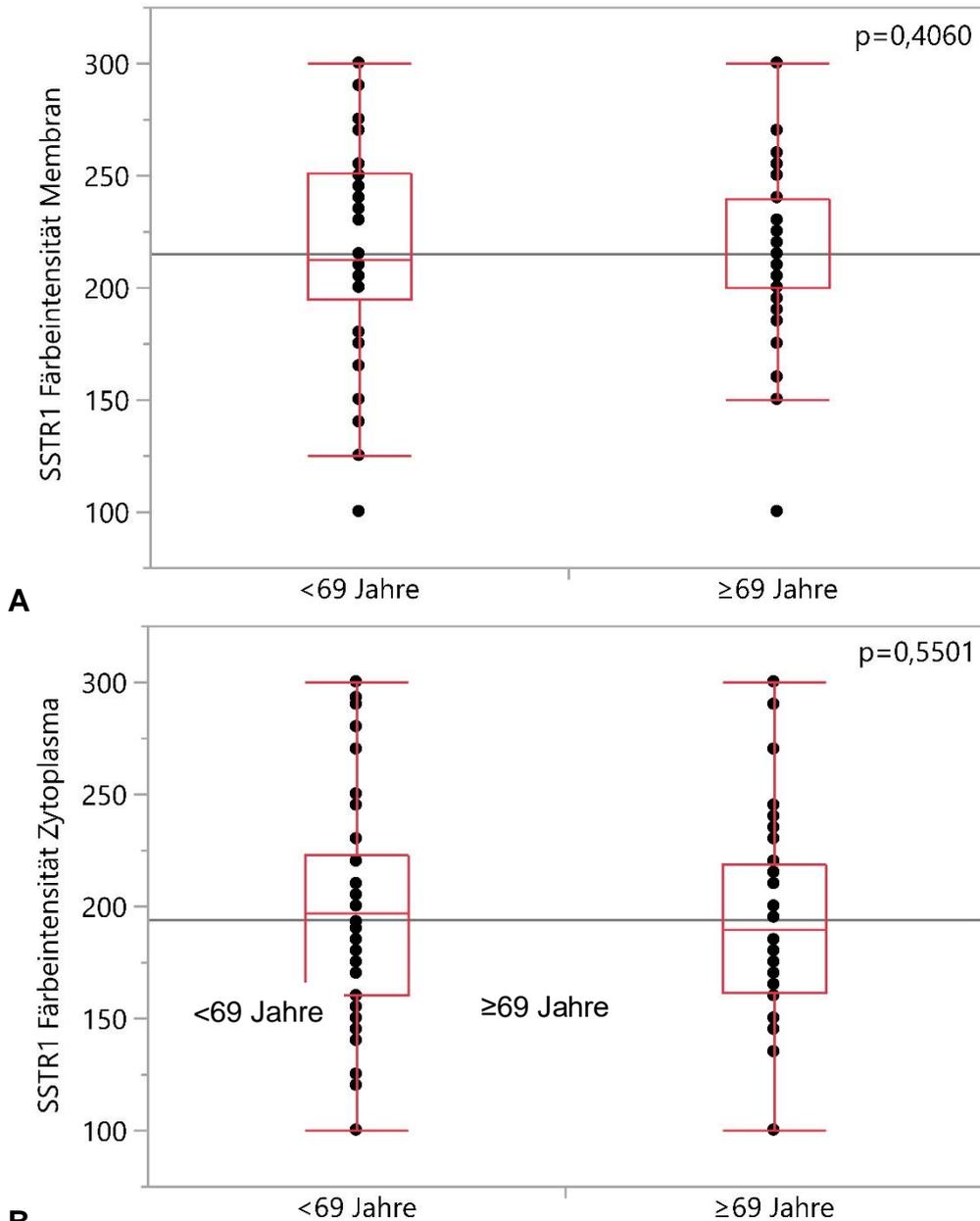


Abb. 68: Korrelation des Patientenalters und der SSTR1-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p= 0,4060$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,5501$). Jeweils Wilcoxon-Test.

Ergebnisse

3.2.7.1.2 SSTR2

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von SSTR2 in Membranen des Tumorgewebes und dem Patientenalter. Mit $p=0,0671$ zeigte sich für die SSTR2-Expression im Zytoplasma von Tumorgewebe die leichte Tendenz, dass ältere Patienten weniger SSTR2 exprimierten (s. Abb.69).

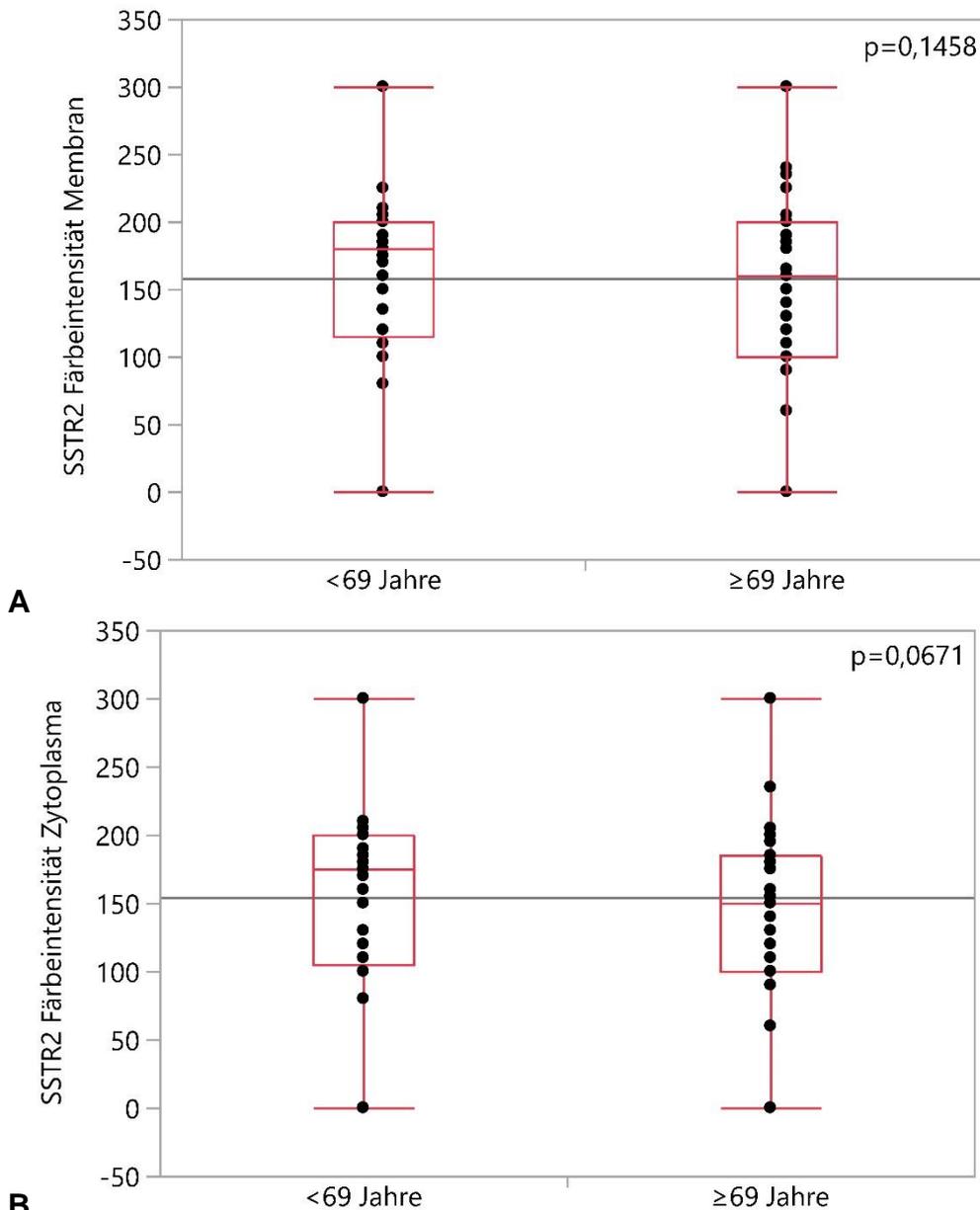


Abb.69: Korrelation des Patientenalters und der SSTR2-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p= 0,1458$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,0671$). Jeweils Wilcoxon-Test.

Ergebnisse

3.2.7.1.3 SSTR3

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von SSTR3 in Membranen oder Zytoplasma des Tumorgewebes mit dem Patientenalter.

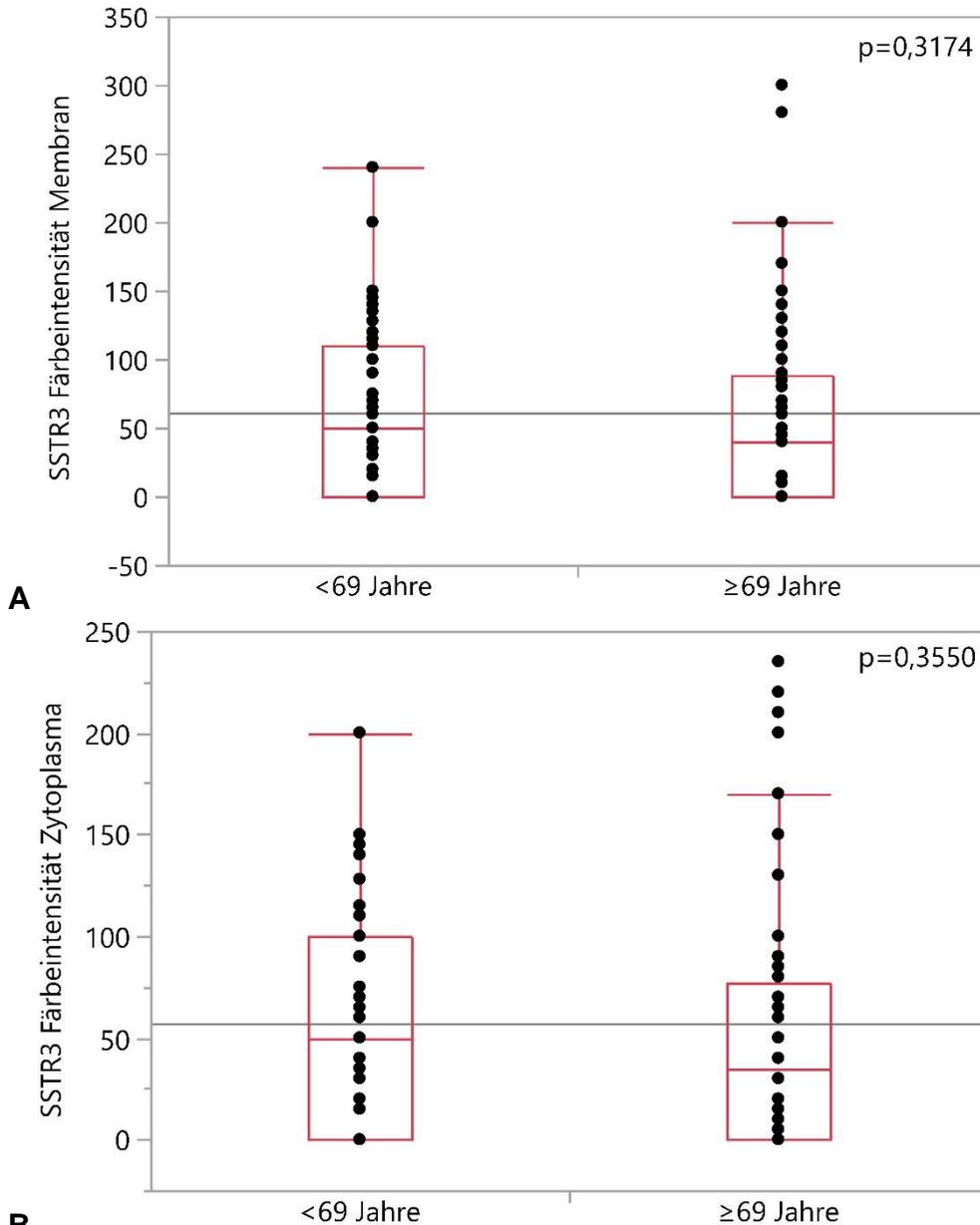


Abb.70: Korrelation des Patientenalters und der SSTR3-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p= 0,3174$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,3550$). Jeweils Wilcoxon-Test.

Ergebnisse

3.2.7.1.4 SSTR4

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von SSTR4 in Membranen oder Zytoplasma des Tumorgewebes mit dem Patientenalter.

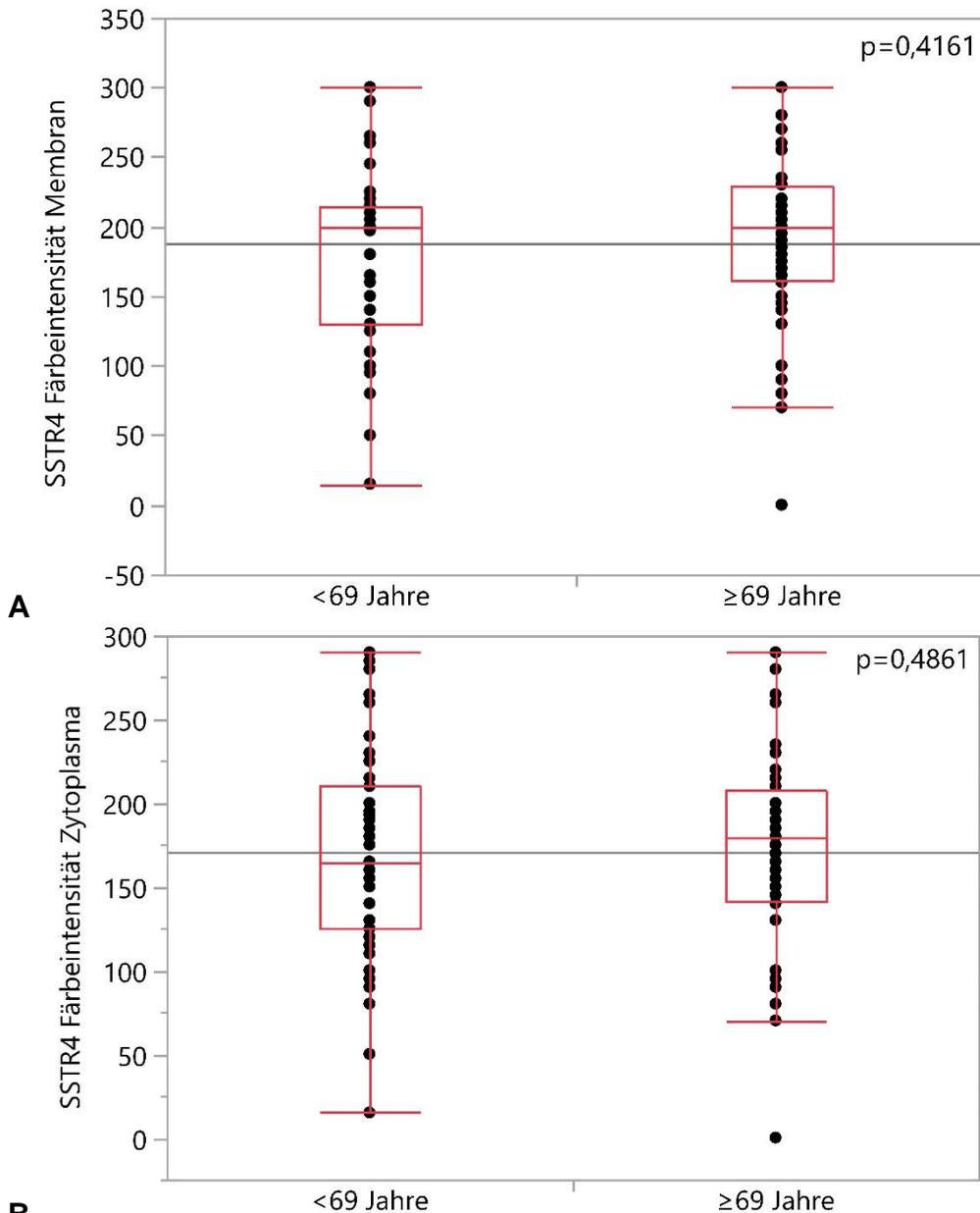


Abb.71: Korrelation des Patientenalters und der SSTR4-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,4161$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,4861$). Jeweils Wilcoxon-Test.

Ergebnisse

3.2.7.1.5 SSTR5

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von SSTR5 in Membranen oder Zytoplasma des Tumorgewebes mit dem Patientenalter.

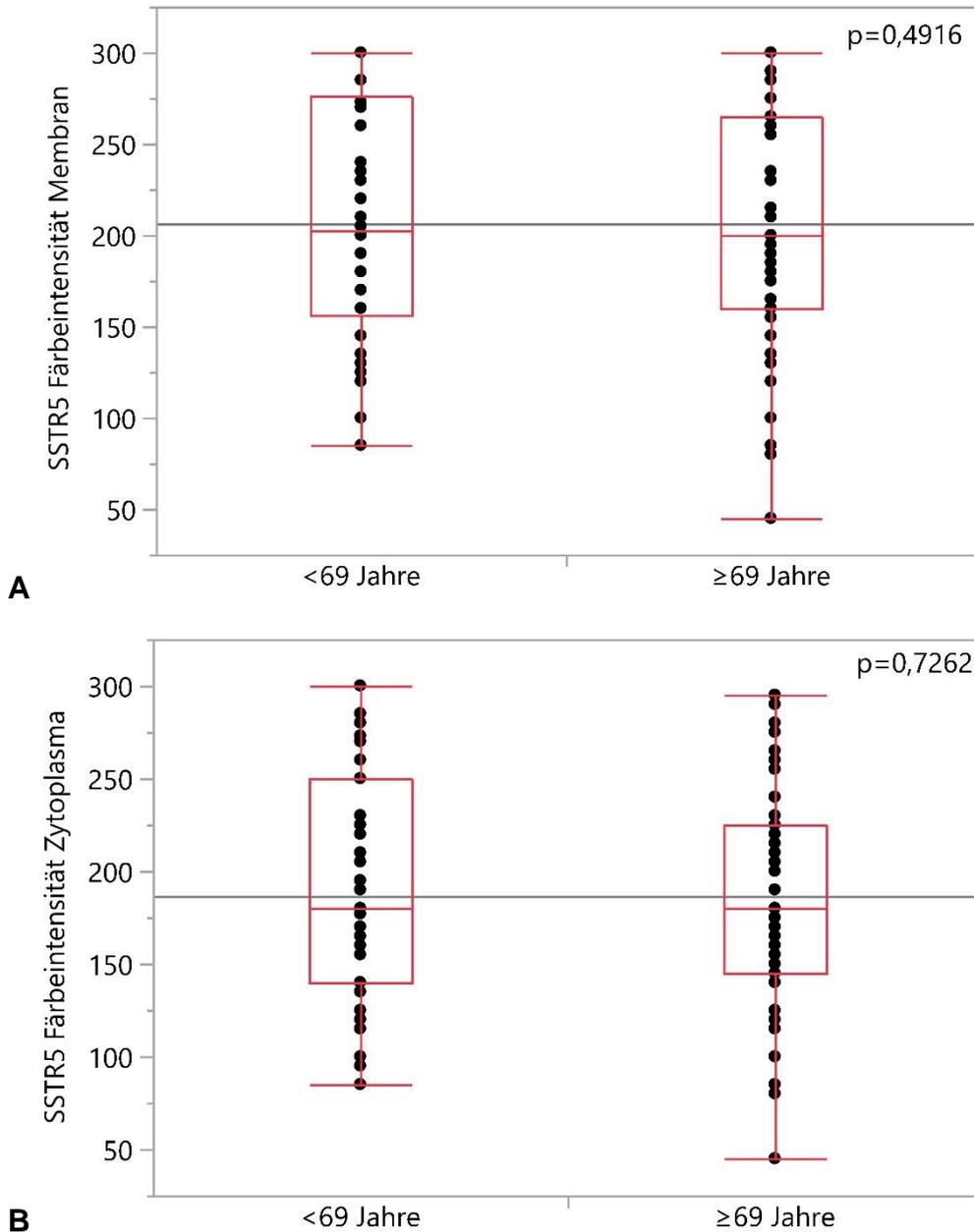


Abb.72: Korrelation des Patientenalters und der SSTR5-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,4916$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,7262$). Jeweils Wilcoxon-Test.

3.2.7.2 Geschlecht

3.2.7.2.1 SSTR1

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von SSTR1 in Membranen oder Zytoplasma des Tumorgewebes mit dem Geschlecht der Patienten.

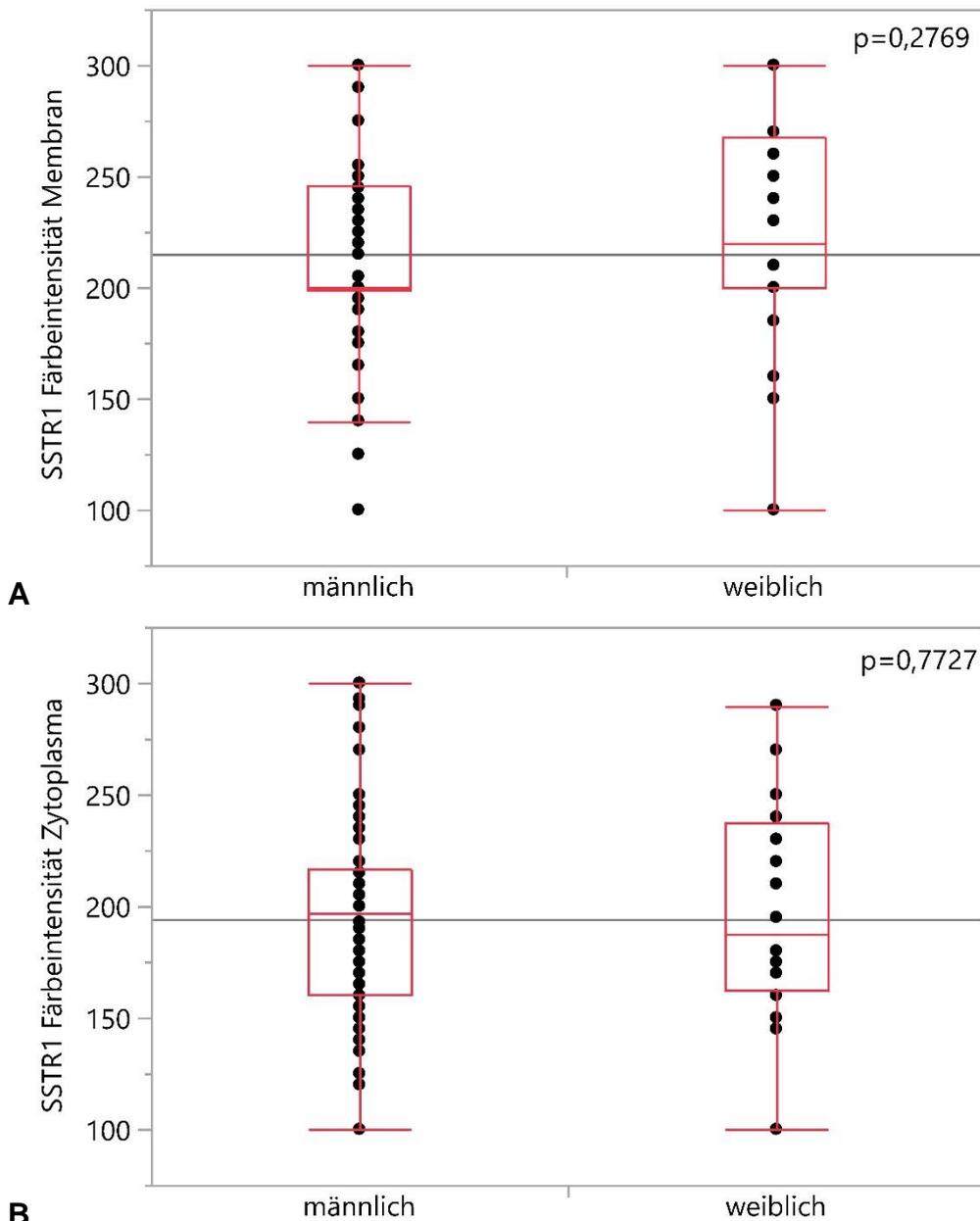


Abb.73: Korrelation des Patientengeschlechts und der SSTR1-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,2769$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,7727$). Jeweils Wilcoxon-Test.

Ergebnisse

3.2.7.2.2 SSTR2

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von SSTR2 in Membranen oder Zytoplasma des Tumorgewebes mit dem Geschlecht der Patienten.

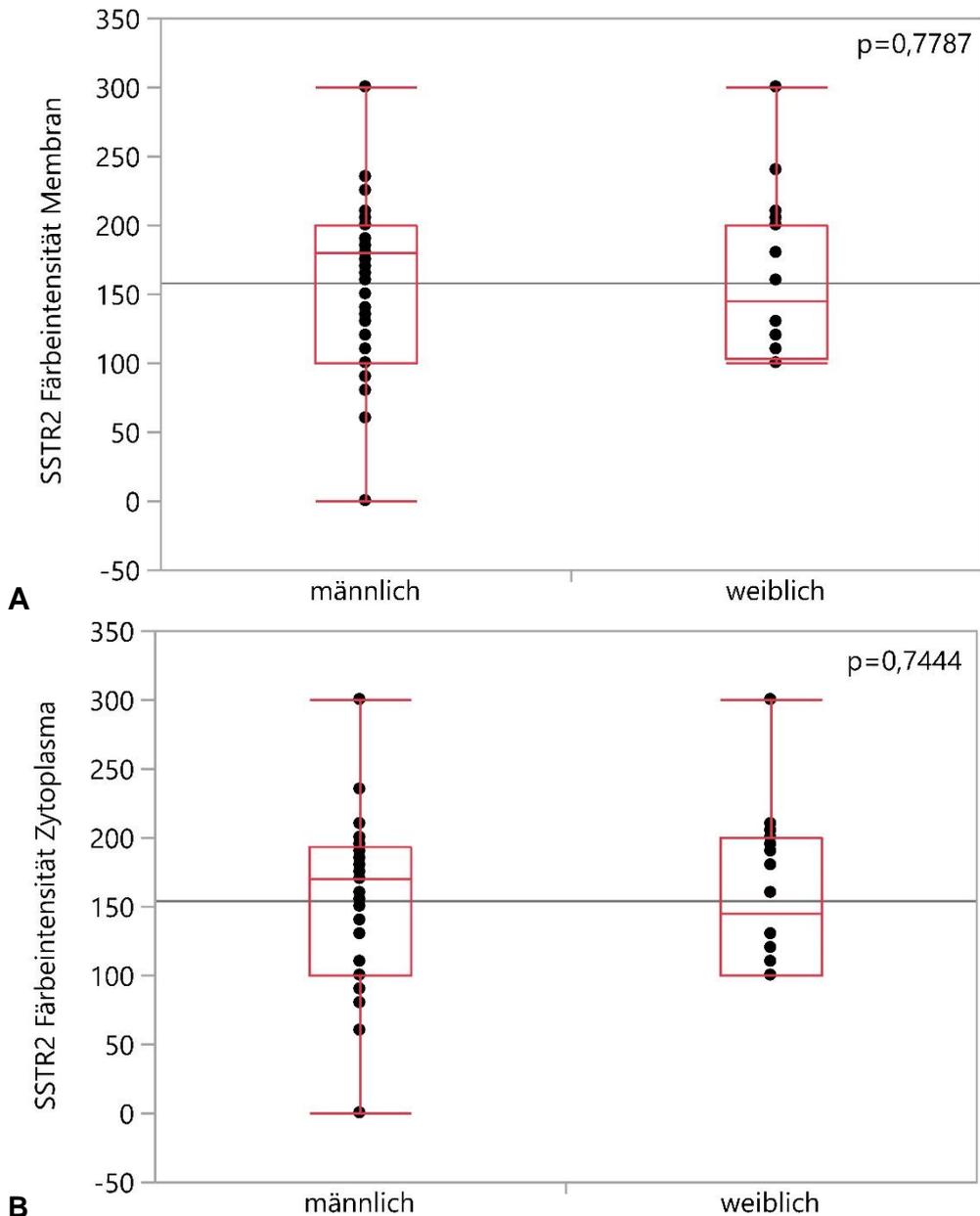


Abb.74: Korrelation des Patientengeschlechts und der SSTR2-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,7787$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,7444$). Jeweils Wilcoxon-Test.

Ergebnisse

3.2.7.2.3 SSTR3

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von SSTR3 in Membranen oder Zytoplasma des Tumorgewebes mit dem Geschlecht der Patienten.

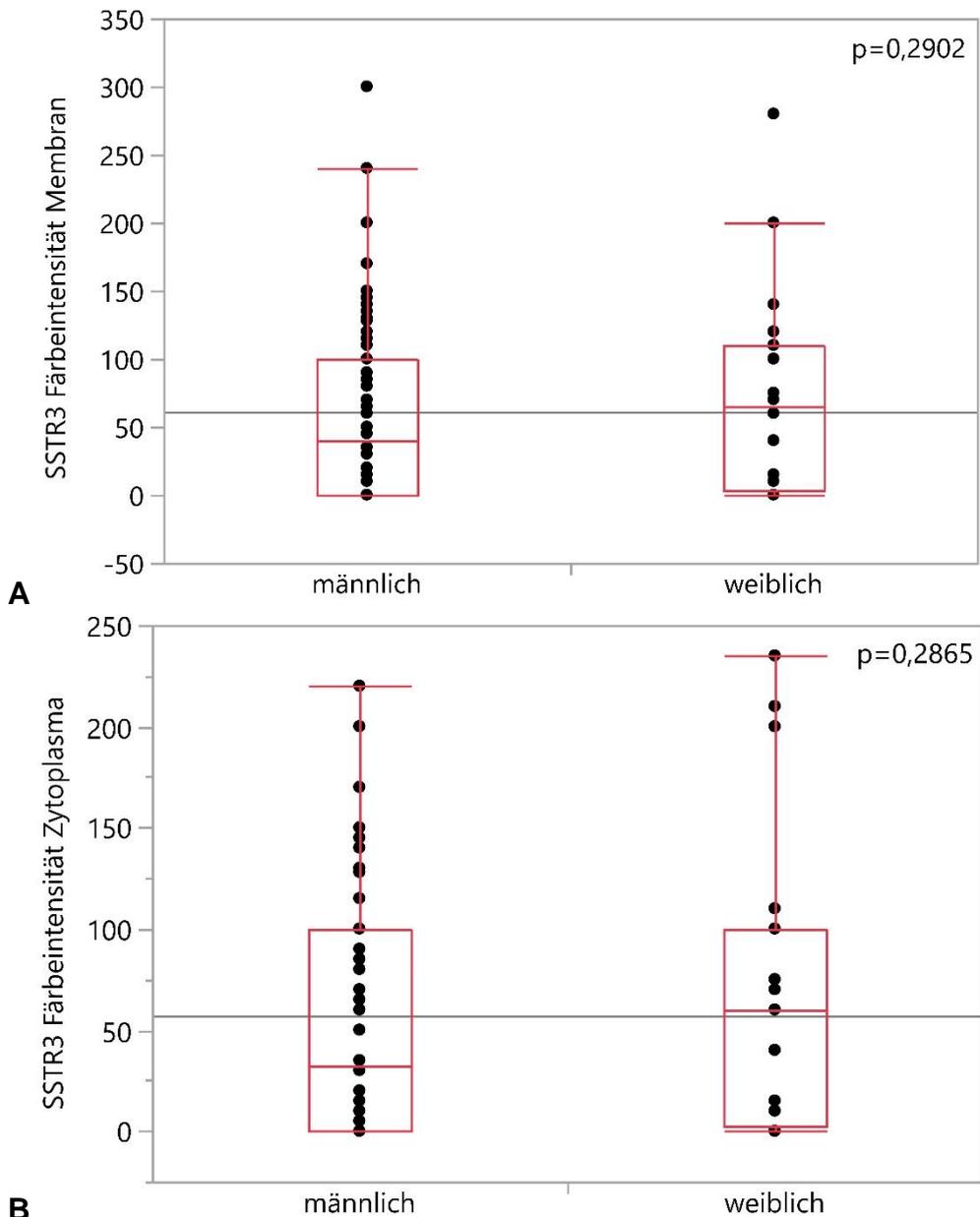


Abb.75: Korrelation des Patientengeschlechts und der SSTR3-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,2902$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,2865$). Jeweils Wilcoxon-Test.

3.2.7.2.4 SSTR4

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von SSTR4 in Membranen oder Zytoplasma des Tumorgewebes mit dem Geschlecht der Patienten.

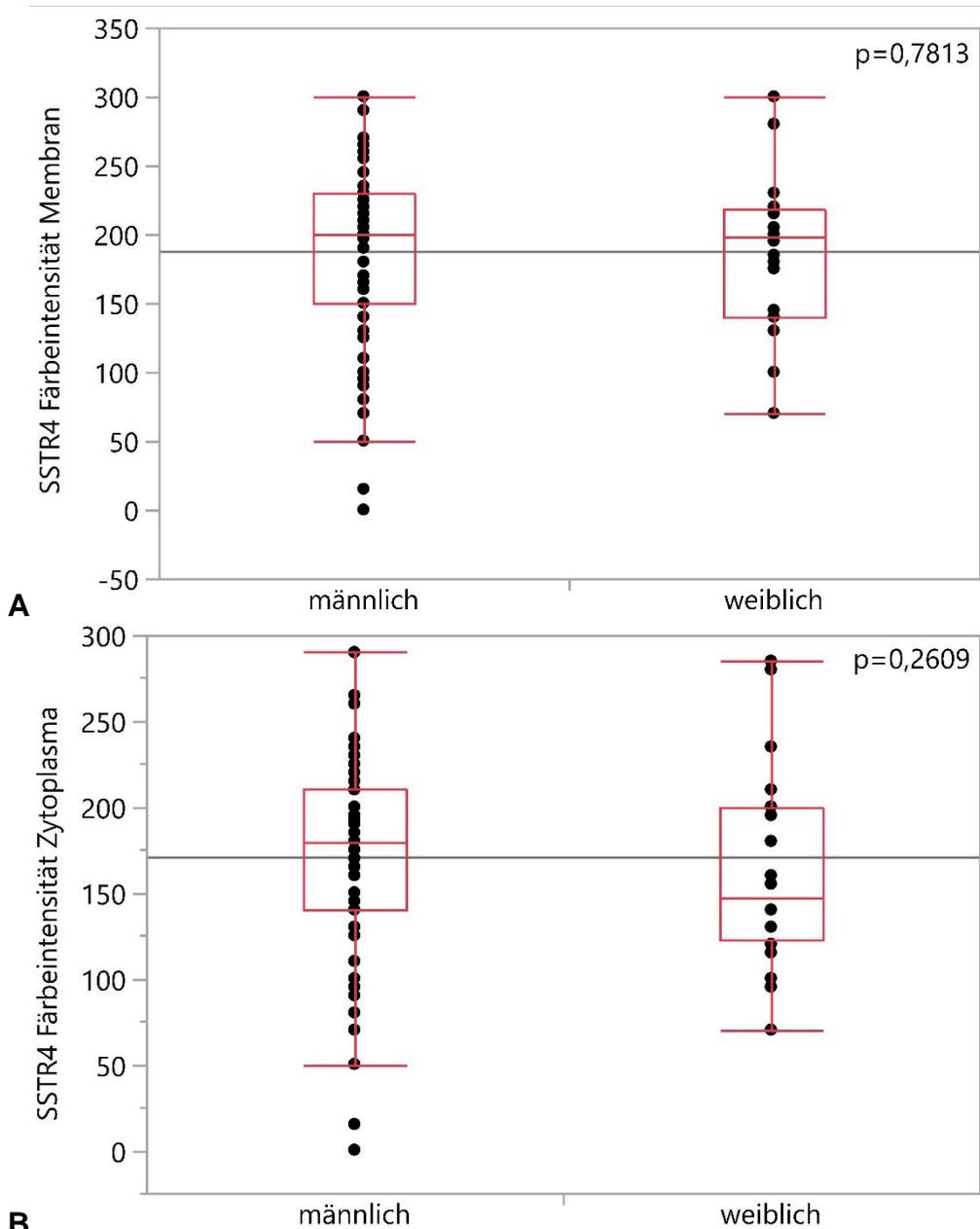


Abb.76: Korrelation des Patientengeschlechts und der SSTR4-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,7813$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,2609$). Jeweils Wilcoxon-Test.

Ergebnisse

3.2.7.2.5 SSTR5

Es zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von SSTR5 in Membranen oder Zytoplasma des Tumorgewebes mit dem Geschlecht der Patienten.

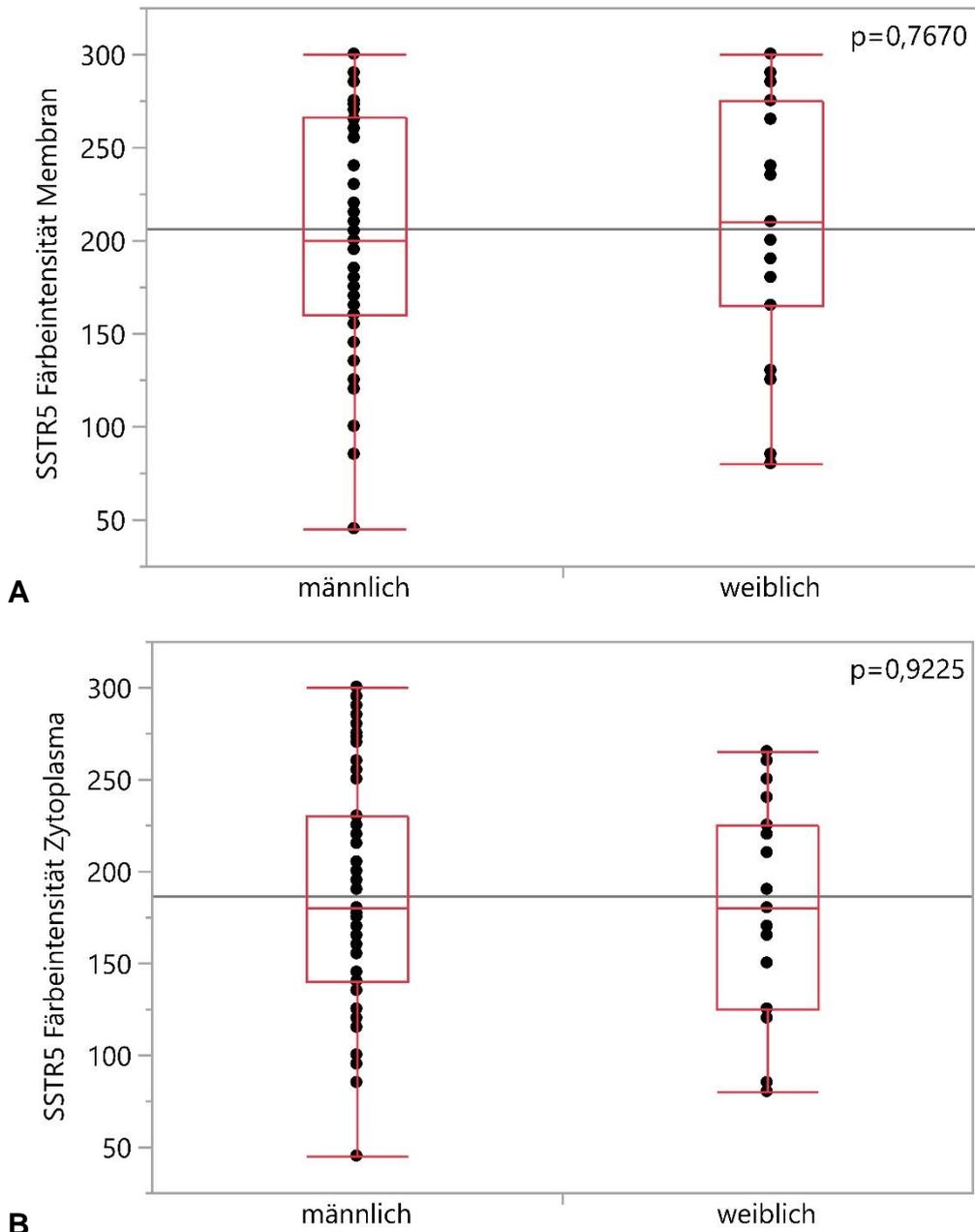


Abb.77: Korrelation des Patientengeschlechts und der SSTR5-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,7670$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,9225$). Jeweils Wilcoxon-Test.

3.2.8 Korrelation mit dem Krankheitsverlauf

3.2.8.1 Rezidiv

Patienten, die nicht R0 reseziert werden konnten oder bei denen zum Zeitpunkt der Operation bereits Noduläre bzw. Fernmetastasen (N1/2/3 bzw. M1) vorlagen, galten nicht als tumorfrei und wurden für die Auswertung des Auftretens eines Rezidivs nicht berücksichtigt.

Für 70 der 103 Patienten (=68%) konnten unter diesen Voraussetzungen Daten zum Auftreten eines Rezidivs erhoben werden. 31 Patienten (44,3%) erlitten ein Rezidiv. Der Zeitraum für das Auftreten eines Rezidivs lag mit einem Median von 44,5 Monaten zwischen 2 und 184 Monaten nach erfolgter Operation. 39 Patienten (55,7%) überlebten rezidivfrei.

3.2.8.1.1 SSTR1

Für die membranständige SSTR1-Expression in Tumorgewebe ergab sich kein signifikanter Zusammenhang mit der rezidivfreien Zeit. Lediglich die mit $p=0,0894$ leichte Tendenz, dass eine erhöhte SSTR1-Expression in den Tumormembranen mit einer längeren rezidivfreien Zeit einherging.

Bei der zytoplasmatischen SSTR1-Expression in Tumorgewebe zeigte sich, dass Patienten mit stärkerer SSTR1-Expression eher rezidivfrei blieben als Patienten mit schwächerer SSTR1-Expression ($p=0,0494$, s. Abb. 78).

Ergebnisse

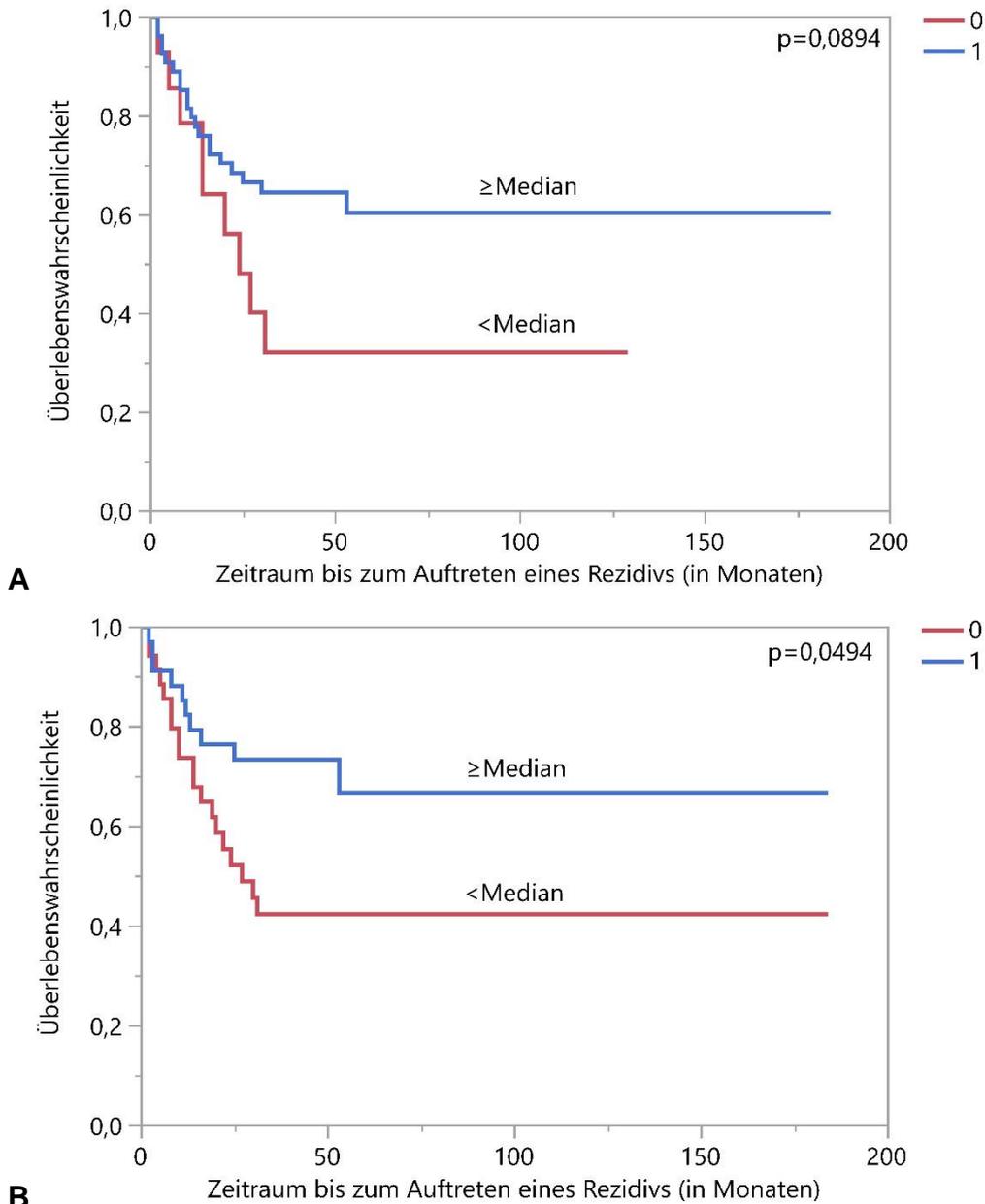


Abb. 78: Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs in Monaten in Abhängigkeit der SSTR1-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,0894$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,0494$). Jeweils Kaplan-Meier-Kurve. SSTR1-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) ≥ Median. Median für SSTR1-Expression in Membranen 200, Median für SSTR1-Expression im Zytoplasma 194.

3.2.8.1.2 SSTR2

Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der SSTR2-Expression in Membranen und Zytoplasmen des Tumorgewebes mit dem Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs (s. Abb.79). Mit $p=0,0791$ zeigte sich

Ergebnisse

die leichte Tendenz, dass eine verstärkte SSTR2-Expression mit einer längeren rezidivfreien Zeit einherging.

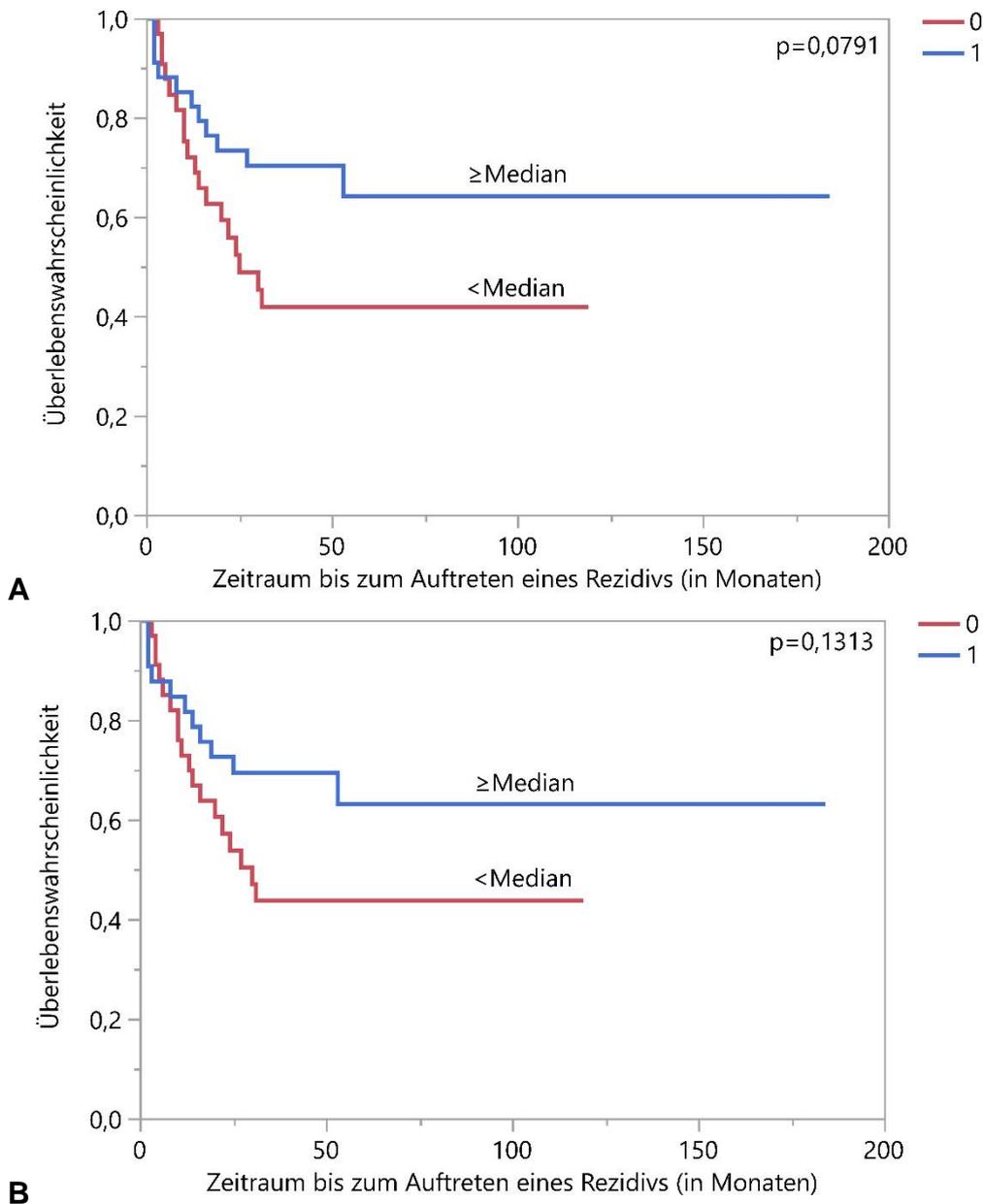


Abb. 79: Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs in Monaten in Abhängigkeit der SSTR2-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,0791$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,1313$). Jeweils Kaplan-Meier-Kurve. SSTR2-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) ≥ Median. Median für SSTR2-Expression in Membranen 177,5, Median für SSTR2-Expression im Zytoplasma 165.

Ergebnisse

3.2.8.1.3 SSTR3

Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der SSTR3-Expression in Membranen und Zytoplasmen des Tumorgewebes mit dem Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs (s. Abb.80).

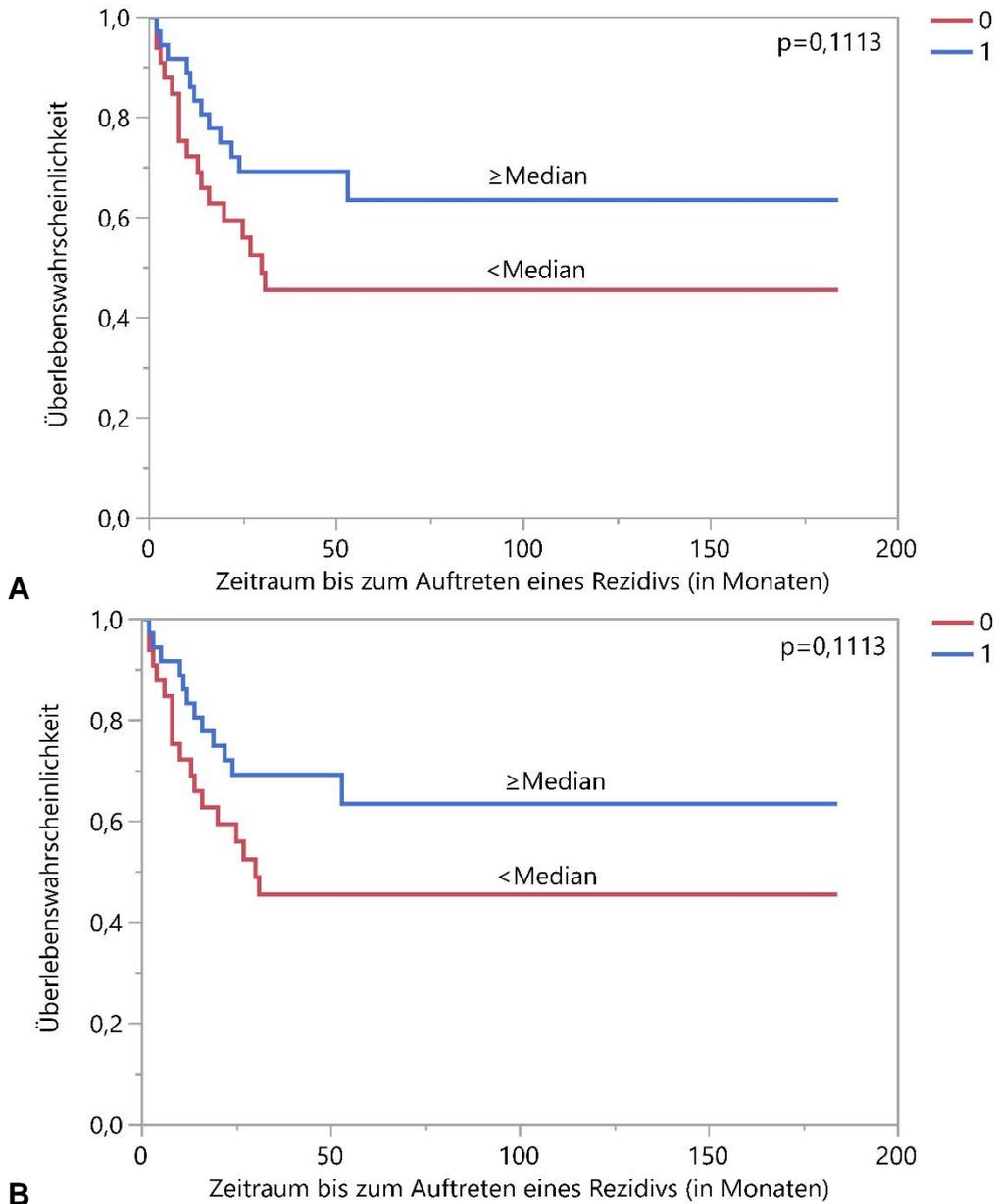


Abb. 80: Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs in Monaten in Abhängigkeit der SSTR3-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,1113$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,1113$).

Jeweils Kaplan-Meier-Kurve. SSTR3-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) ≥ Median. Median für SSTR3-Expression in Membranen 47,5, Median für SSTR3-Expression im Zytoplasma 45.

Ergebnisse

3.2.8.1.4 SSTR4

Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der SSTR4-Expression in Membranen und Zytoplasmen des Tumorgewebes mit dem Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs (s. Abb.81).

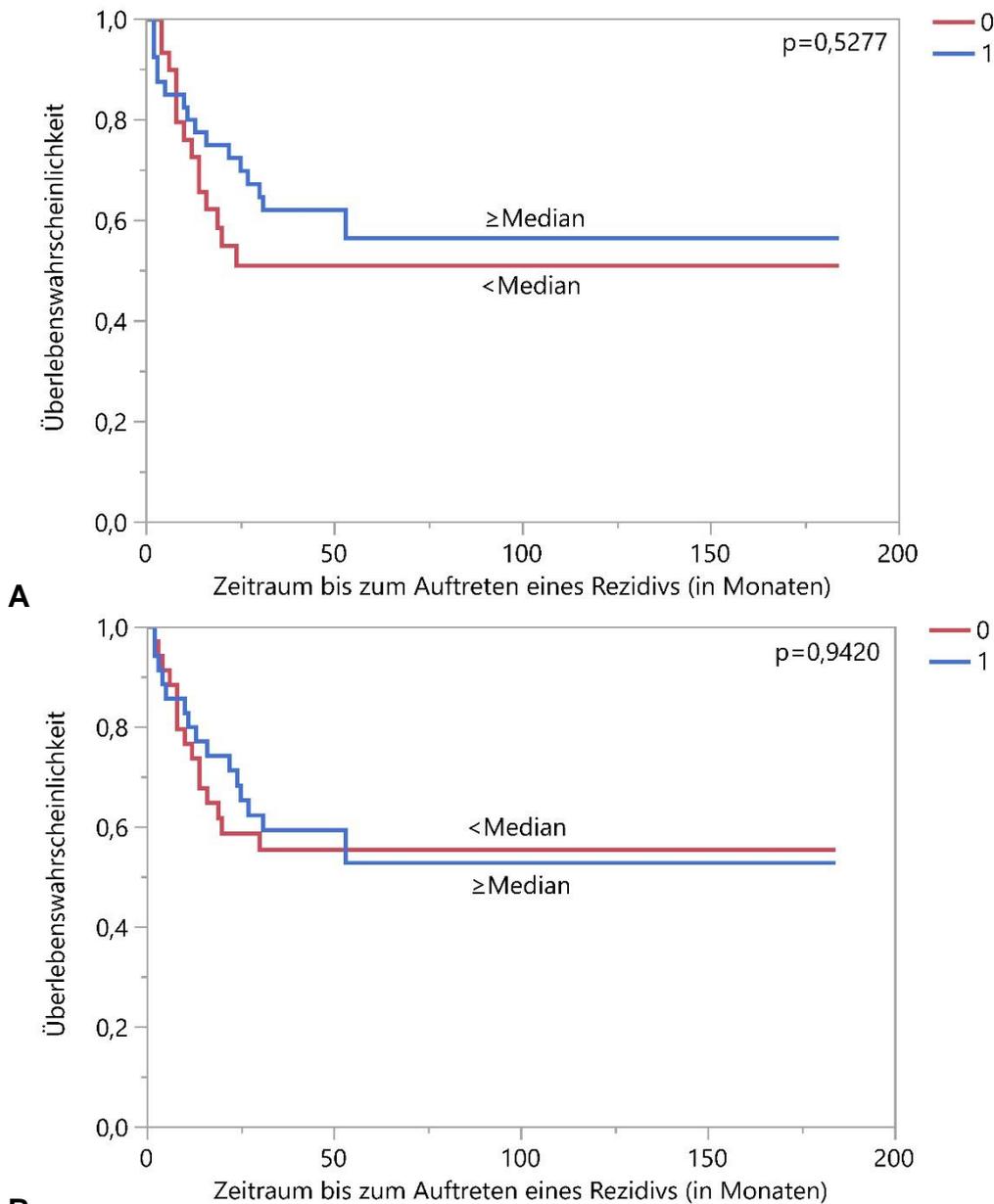


Abb. 81: Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs in Monaten in Abhängigkeit der SSTR4-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,5277$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,9420$). Jeweils Kaplan-Meier-Kurve. SSTR4-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) ≥ Median. Median für SSTR4-Expression in Membranen 200, Median für SSTR4-Expression im Zytoplasma 180.

Ergebnisse

3.2.8.1.5 SSTR5

Es ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der SSTR5-Expression in Membranen und Zytoplasmen des Tumorgewebes mit dem Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs (s. Abb.82).

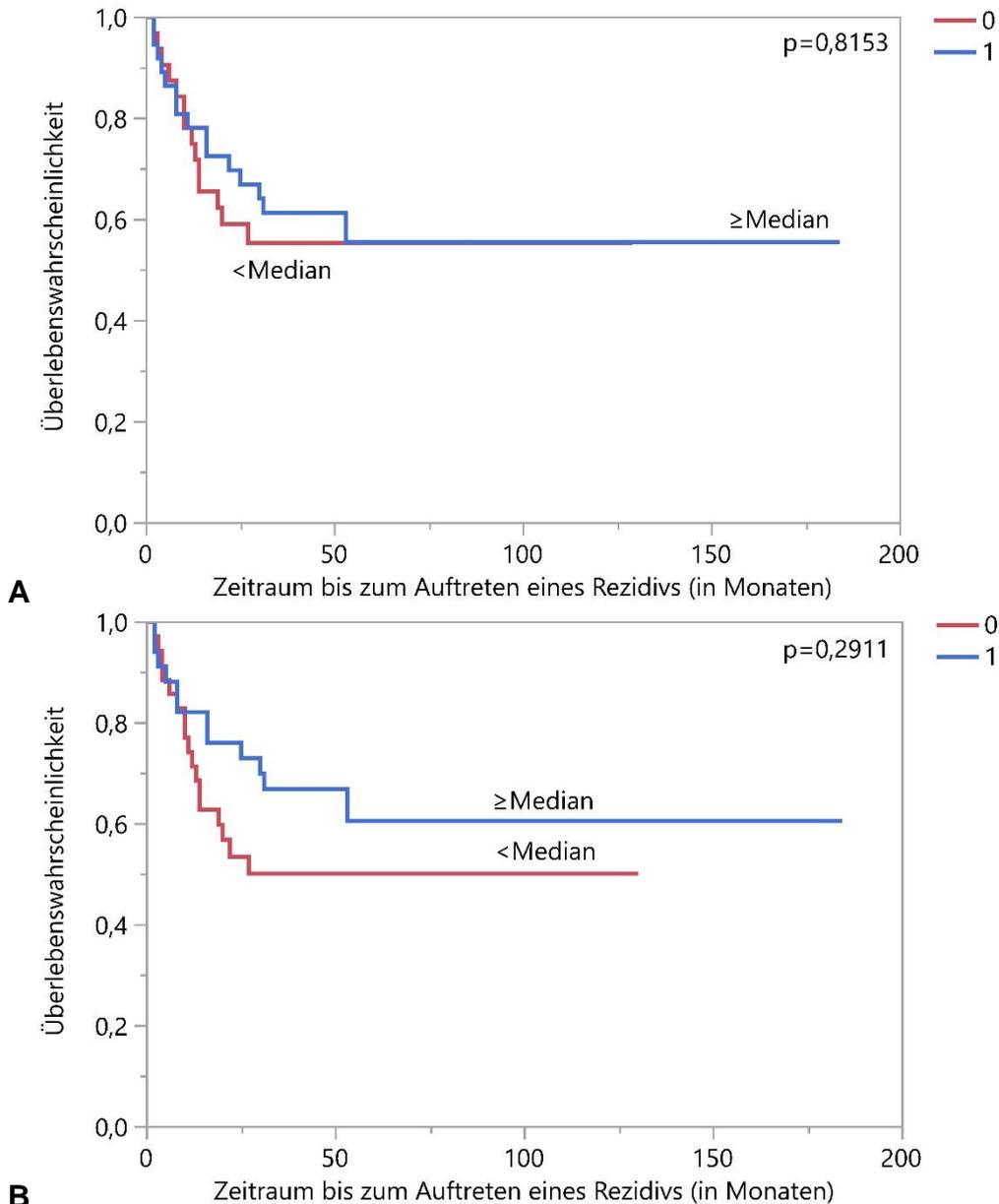


Abb. 82: Zeitraum bis zum Auftreten eines Rezidivs in Monaten in Abhängigkeit der SSTR5-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,8153$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,2911$).

Jeweils Kaplan-Meier-Kurve. SSTR5-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) ≥ Median. Median für SSTR5-Expression in Membranen 200, Median für SSTR5-Expression im Zytoplasma 180.

3.2.8.2 Tumorspezifisches Überleben

Für 91 der 103 Patienten (=93,7%) konnten Daten zum tumorspezifischen Überleben (cancer specific survival, CSS) erhoben werden. Dabei verstarben die Patienten tumorspezifisch zwischen 3 und 184 Monaten nach der OP. Der Median lag bei 31 Monaten. 44 Patienten (=48,4%) verstarben abhängig von ihrem Tumorleiden, 47 Patienten (=51,6%) unabhängig davon.

3.2.8.2.1 SSTR1

Es konnte ein signifikanter Zusammenhang ($p=0,0411$) nachgewiesen werden zwischen der membranösen Expression von SSTR1 in Tumorgewebe und der tumorspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit. Patienten, in deren Tumormembranen viel SSTR1 exprimiert wurde, lebten tumorspezifisch länger als Patienten, die weniger SSTR1 exprimierten (siehe Abb. 83).

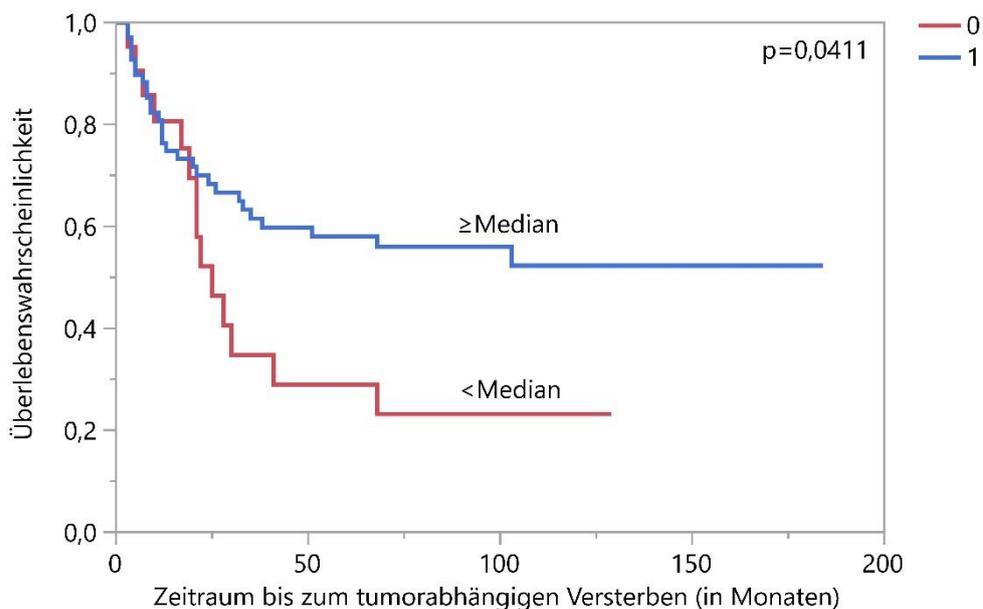


Abb. 83: Zeitraum bis zum tumorabhängigen Versterben in Monaten in Abhängigkeit der SSTR1-Expression in Membranen des Tumorgewebes, Kaplan-Meier-Kurve ($p=0,0411$). Membranständige SSTR1-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) \geq Median, Median 200.

Ebenso konnte aufgezeigt werden, dass es einen signifikanten Zusammenhang ($p=0,0180$) zwischen der zytoplasmatischen SSTR1-Expression und der tumorspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit gibt (siehe Abb. 84). Auch hier lebten Patienten länger, deren Tumorzellen viel SSTR1 exprimierten.

Ergebnisse

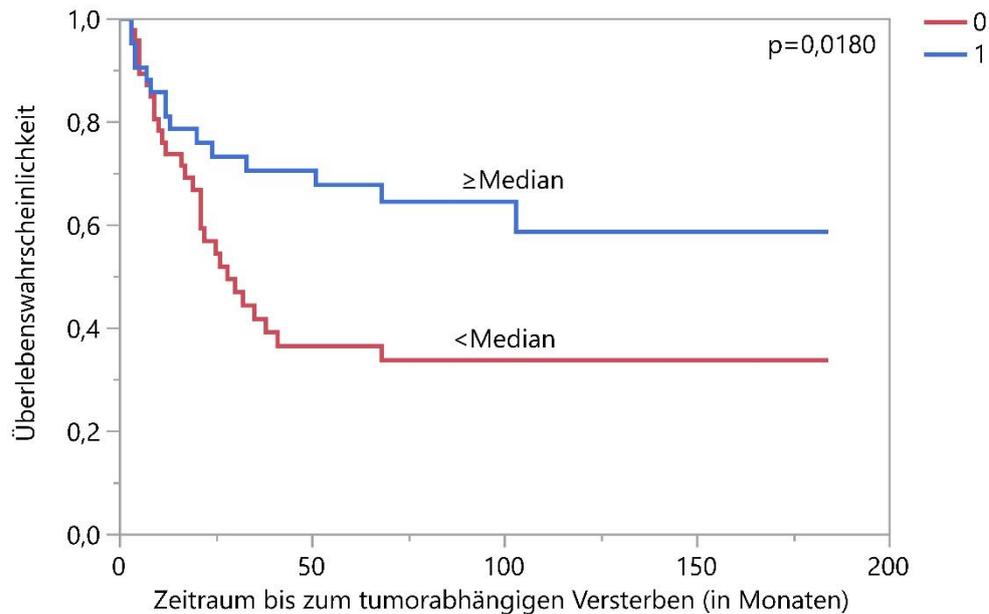
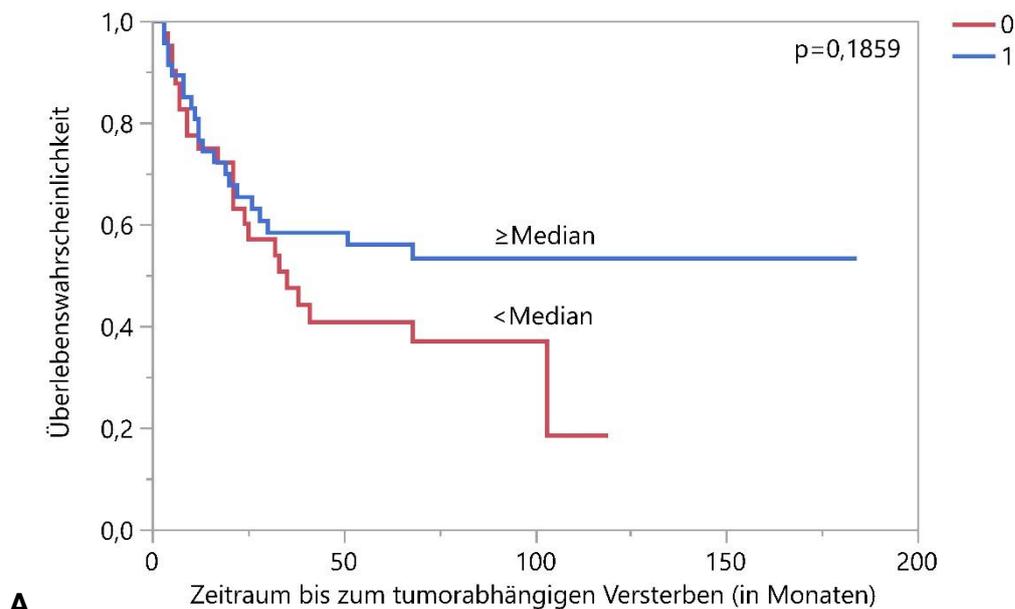


Abb. 84: Zeitraum bis zum tumorabhängigen Versterben in Monaten in Abhängigkeit der SSTR1-Expression im Zytoplasma des Tumorgewebes, Kaplan-Meier-Kurve ($p=0,0180$). Zytoplasmatische SSTR1-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) \geq Median, Median 194.

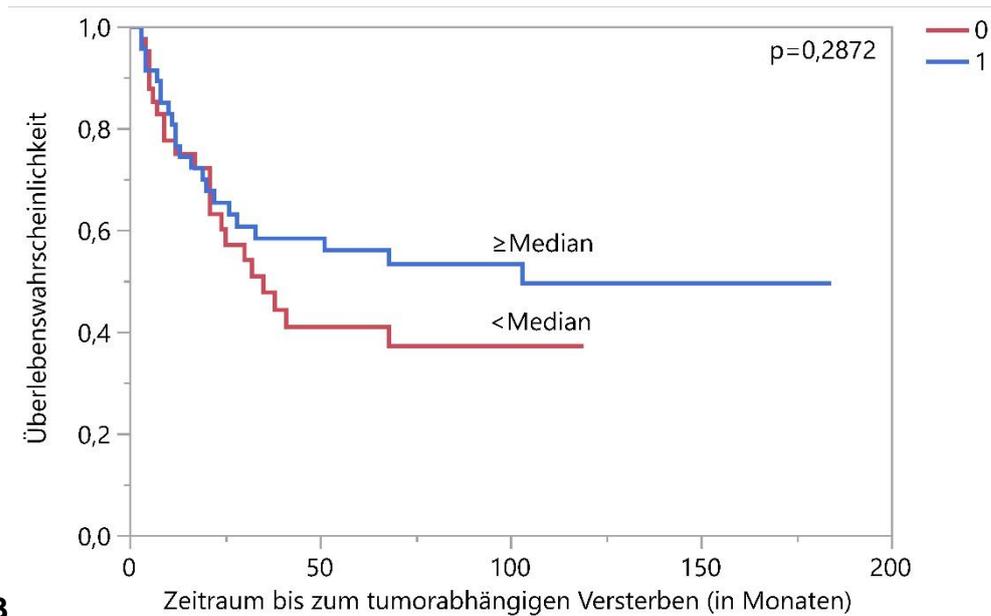
3.2.8.2.2 SSTR2

Für den Zusammenhang der Expression von SSTR2 und dem tumorspezifischen Überleben konnte weder für eine membranständige noch für eine zytoplasmatische Rezeptorexpression in Tumorgewebe ein signifikantes Ergebnis festgestellt werden.



A

Ergebnisse



B Zeitraum bis zum tumorabhängigen Versterben in Monaten in Abhängigkeit der SSTR2-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,1859$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,2872$). Jeweils Kaplan-Meier-Kurve. SSTR2-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) ≥ Median. Median für SSTR2-Expression in Membranen 177,5, Median für SSTR2-Expression im Zytoplasma 165.

3.2.8.2.3 SSTR3

Es konnte sowohl für die membranöse als auch die zytoplasmatische Expression von SSTR3 ein signifikanter Zusammenhang (jeweils $p=0,0291$) festgestellt werden mit der tumorspezifischen Überlebenswahrscheinlichkeit. Patienten, in deren Tumormembranen oder -zytoplasmen viel SSTR3 exprimiert wurde, lebten tumorspezifisch länger als Patienten, die weniger SSTR3 exprimierten (siehe Abb. 86 und 87).

Ergebnisse

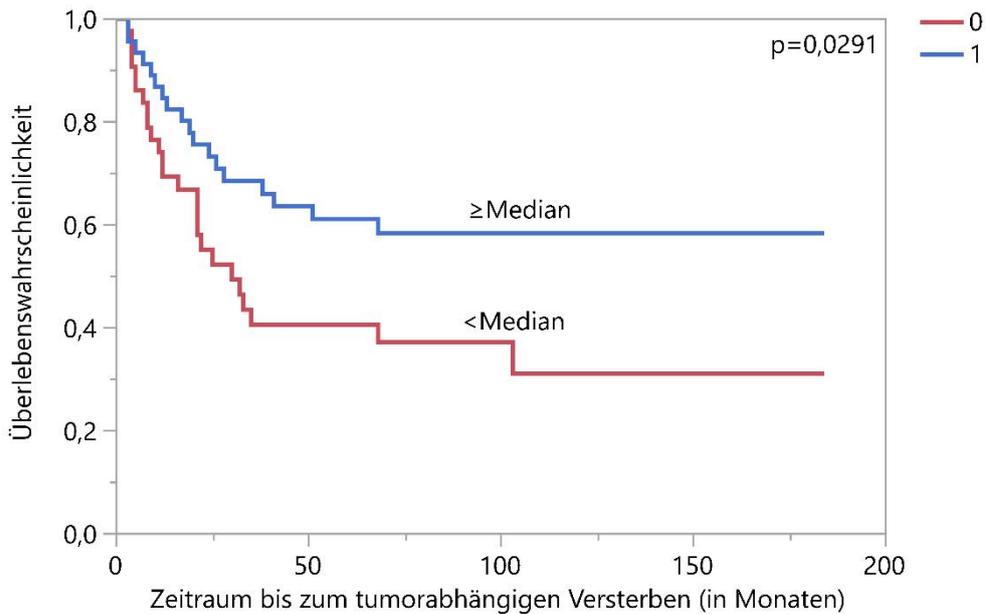


Abb. 86: Zeitraum bis zum tumorabhängigen Versterben in Monaten in Abhängigkeit der SSTR3-Expression in Membranen des Tumorgewebes, Kaplan-Meier-Kurve ($p=0,0291$). Membranständige SSTR3-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) ≥ Median, Median 47,5.

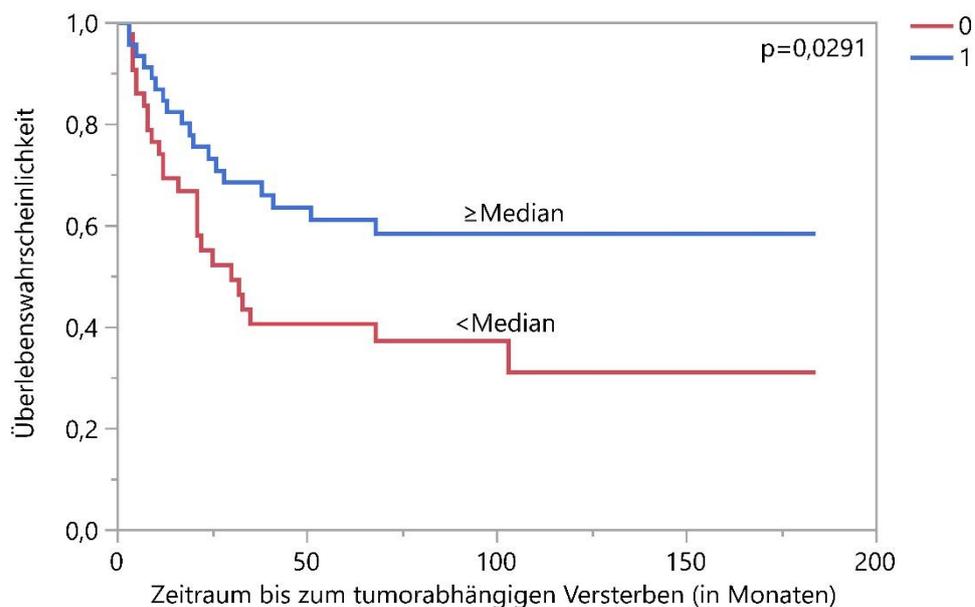


Abb. 87: Zeitraum bis zum tumorabhängigen Versterben in Monaten in Abhängigkeit der SSTR3-Expression im Zytoplasma des Tumorgewebes, Kaplan-Meier-Kurve ($p=0,0291$). Zytoplasmatische SSTR3-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) ≥ Median, Median 45.

3.2.8.2.4 SSTR4

Für den Zusammenhang der Expression von SSTR4 und dem tumorspezifischen Überleben ergab sich die Tendenz, dass Patienten mit einer hohen

Ergebnisse

membranösen SSTR4-Expression länger tumorspezifisch überlebten ($p=0,0879$). Für die zytoplasmatischen Rezeptoren ergab sich keine Tendenz.

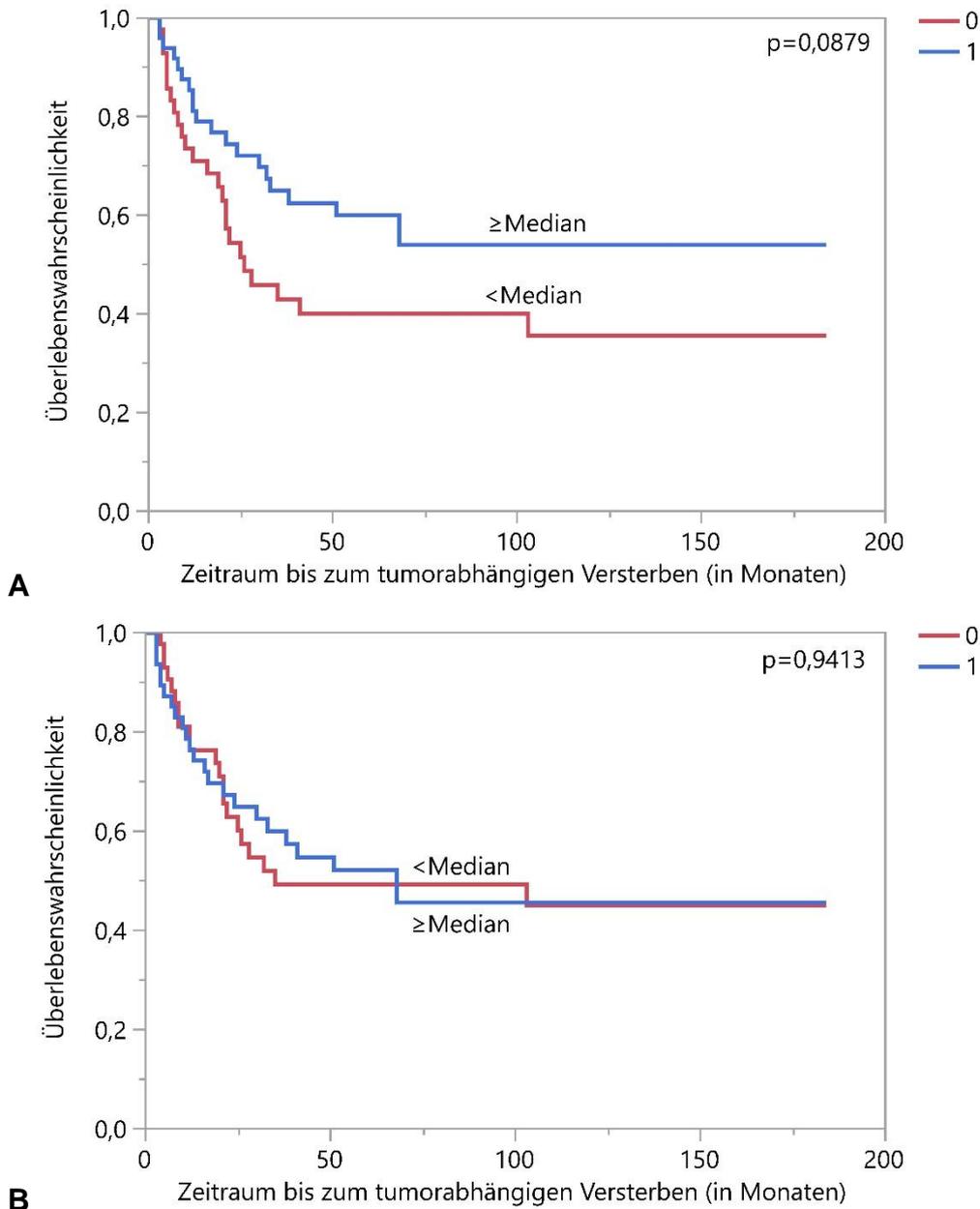


Abb.88: Zeitraum bis zum tumorabhängigen Versterben in Monaten in Abhängigkeit der SSTR4-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,0879$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,9413$).

Jeweils Kaplan-Meier-Kurve. SSTR4-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) ≥ Median. Median für SSTR4-Expression in Membranen 200, Median für SSTR4-Expression im Zytoplasma 180.

Ergebnisse

3.2.8.2.5 SSTR5

Weder für eine membranständige noch für eine zytoplasmatische Rezeptorexpression von SSTR5 in Tumorgewebe konnte ein Zusammenhang mit dem tumorspezifischen Überleben festgestellt werden.

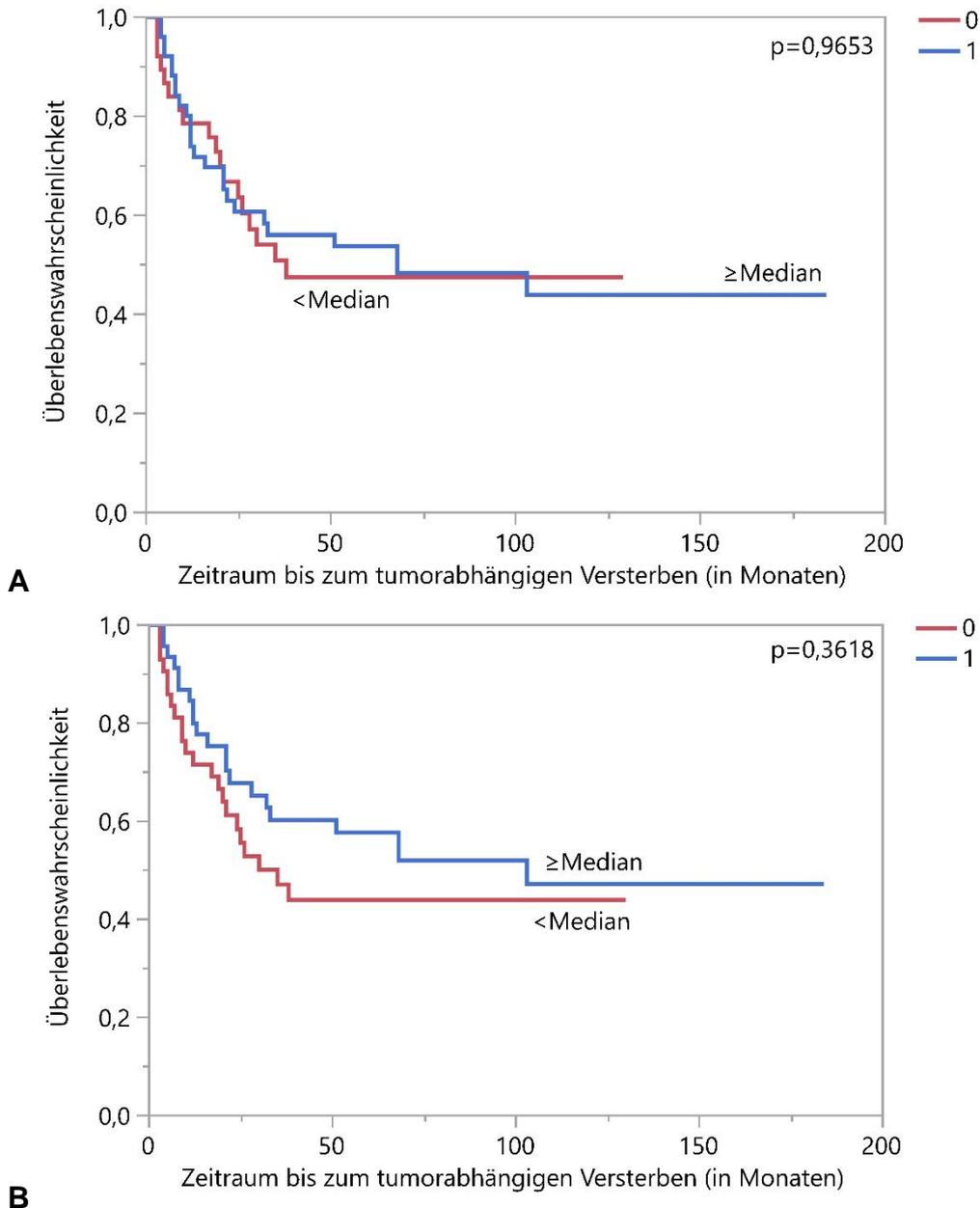


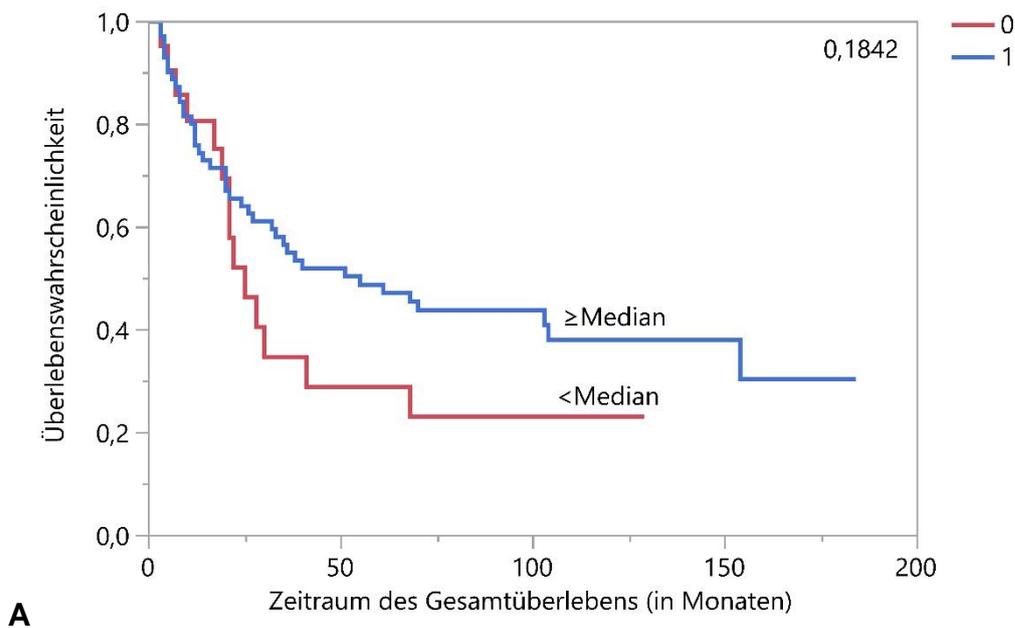
Abb.89: Zeitraum bis zum tumorabhängigen Versterben in Monaten in Abhängigkeit der SSTR5-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,9653$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,3618$). Jeweils Kaplan-Meier-Kurve. SSTR5-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) ≥ Median. Median für SSTR5-Expression in Membranen 200, Median für SSTR5-Expression im Zytoplasma 180.

3.2.8.3 Gesamtüberleben

Für das Gesamtüberleben (overall survival, OS) konnten bis Ende der Erhebung am 02.08.2013 Daten von 94 der 103 Patienten (= 91,3%) erhoben werden. Zu diesem Zeitpunkt lebten noch 38 Patienten (=40,4%), 56 Patienten (=59,6%) waren bereits verstorben. Die Dauer des Gesamtüberlebens lag zwischen 3 und 184 Monaten (Median 30,5 Monate).

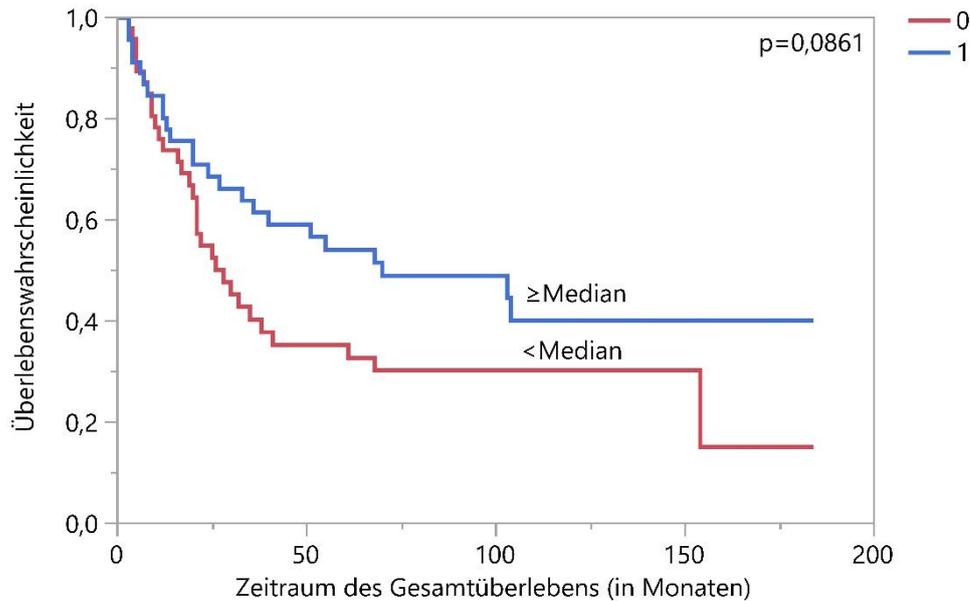
3.2.8.3.1 SSTR1

Es zeigten sich weder für die membranständige noch für die zytoplasmatische SSTR1-Expression in Tumorgewebe ein signifikanter Zusammenhang mit der Überlebenschance. Mit $p=0,0861$ zeigte sich allenfalls die leichte Tendenz einer höheren Überlebenschance bei hoher zytoplasmatischer SSTR1-Expression in Tumorgewebe.



A

Ergebnisse



B

Abb.90: Zeitraum des Gesamtüberlebens in Monaten in Abhängigkeit der SSTR1-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,1842$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,0861$).

Jeweils Kaplan-Meier-Kurve. SSTR1-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) \geq Median. Median für SSTR1-Expression in Membranen 200, Median für SSTR1-Expression im Zytoplasma 194.

3.2.8.3.2 SSTR2

Beim Vergleich des Gesamtüberlebens mit der SSTR2-Expression in Tumorgewebe konnte für die membranständige Expression ein signifikantes Ergebnis nachgewiesen werden ($p=0,0449$). Patienten, deren Tumormembranen viel SSTR2 exprimierten, hatten eine bessere Prognose (siehe Abb. 91).

Ergebnisse

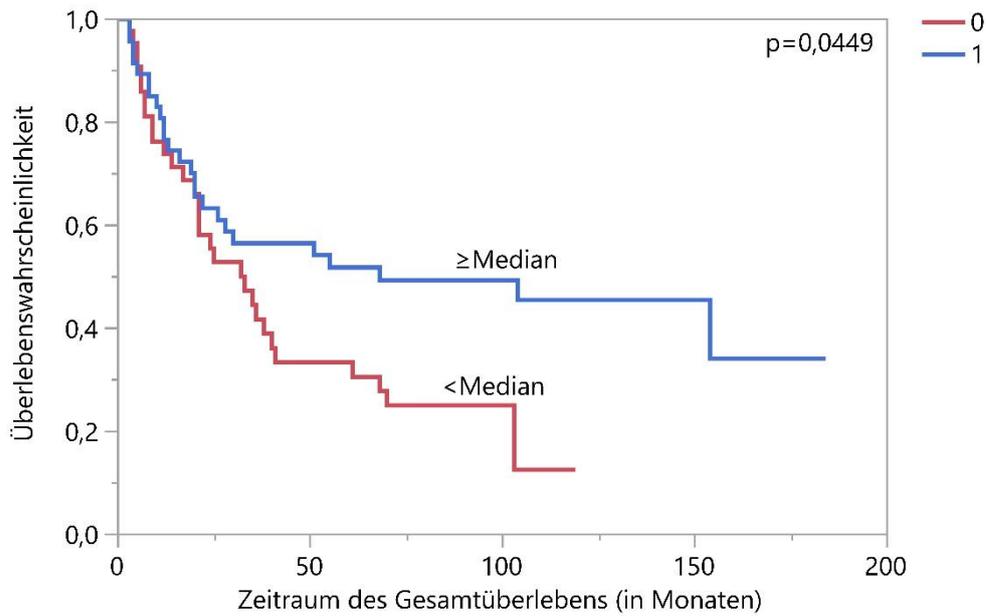


Abb. 91: Zeitraum des Gesamtüberlebens in Monaten in Abhängigkeit der SSTR2-Expression in Membranen des Tumorgewebes, Kaplan-Meier-Kurve ($p=0,0449$). Membranständige SSTR2-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) \geq Median, Median 177,5.

Für die zytoplasmatische SSTR2-Expression konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben festgestellt werden. Es zeigte sich mit $p=0,0759$ allenfalls der Trend zur Unterschiedlichkeit. Auch hier ging die niedrige SSTR2-Expression mit einer schlechten Prognose einher.

Ergebnisse

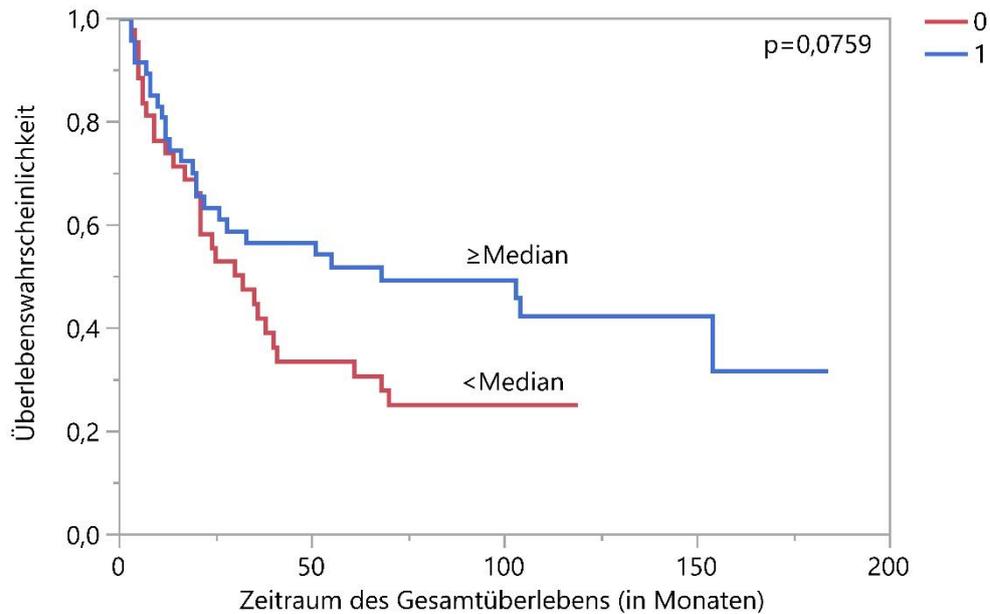


Abb. 92: Zeitraum des Gesamtüberlebens in Monaten in Abhängigkeit der SSTR2-Expression im Zytoplasma des Tumorgewebes, Kaplan-Meier-Kurve ($p=0,0759$). Zytoplasmatische SSTR2-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) \geq Median, Median 165.

3.2.8.3.3 SSTR3

Bei Betrachtung des Gesamtüberlebens in Abhängigkeit von der SSTR3-Expression zeigten sich sowohl für die membranständige als auch die zytoplasmatische Expression mit jeweils $p=0,004$ signifikante Zusammenhänge. Patienten mit einer schwachen SSTR3-Expression hatten eine niedrigere Überlebenswahrscheinlichkeit als solche mit starker Expression (siehe Abb. 93 und 94).

Ergebnisse

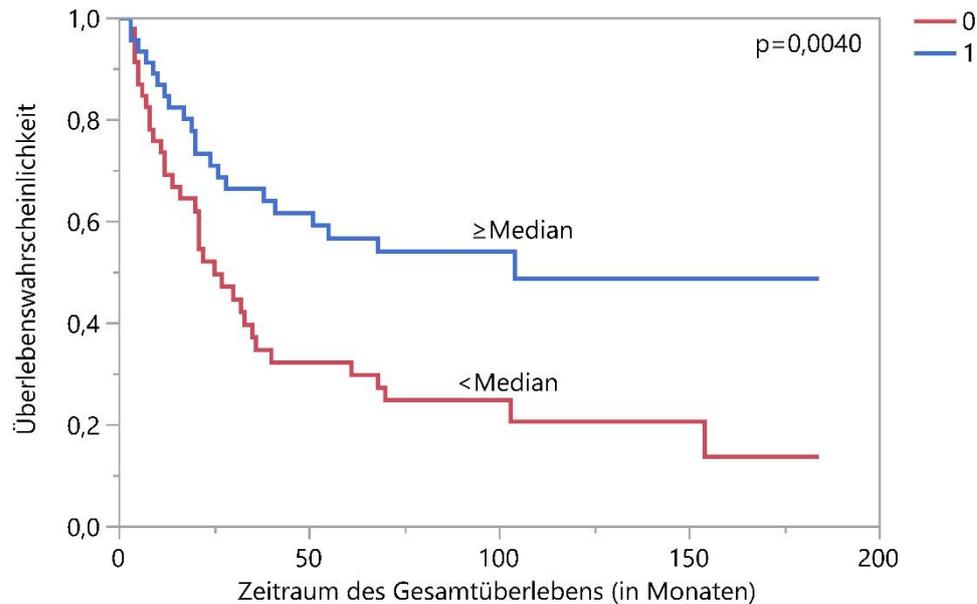


Abb.93: Zeitraum des Gesamtüberlebens in Monaten in Abhängigkeit der SSTR3-Expression in Membranen des Tumorgewebes, Kaplan-Meier-Kurve ($p=0,0040$). Membranständige SSTR3-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) ≥ Median, Median 47,5.

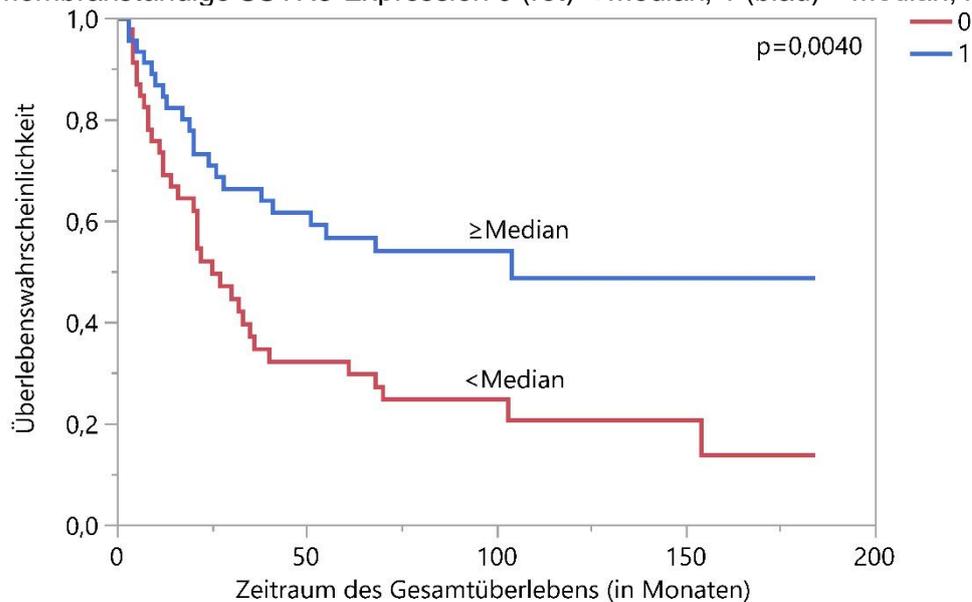


Abb. 94: Zeitraum Gesamtüberlebens in Monaten in Abhängigkeit der SSTR3-Expression im Zytoplasma des Tumorgewebes, Kaplan-Meier-Kurve ($p=0,0040$). Membranständige SSTR3-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) ≥ Median, Median 45.

3.2.8.3.4 SSTR4

Für die membranständige und die zytoplasmatische SSTR4-Expression konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben festgestellt werden.

Ergebnisse

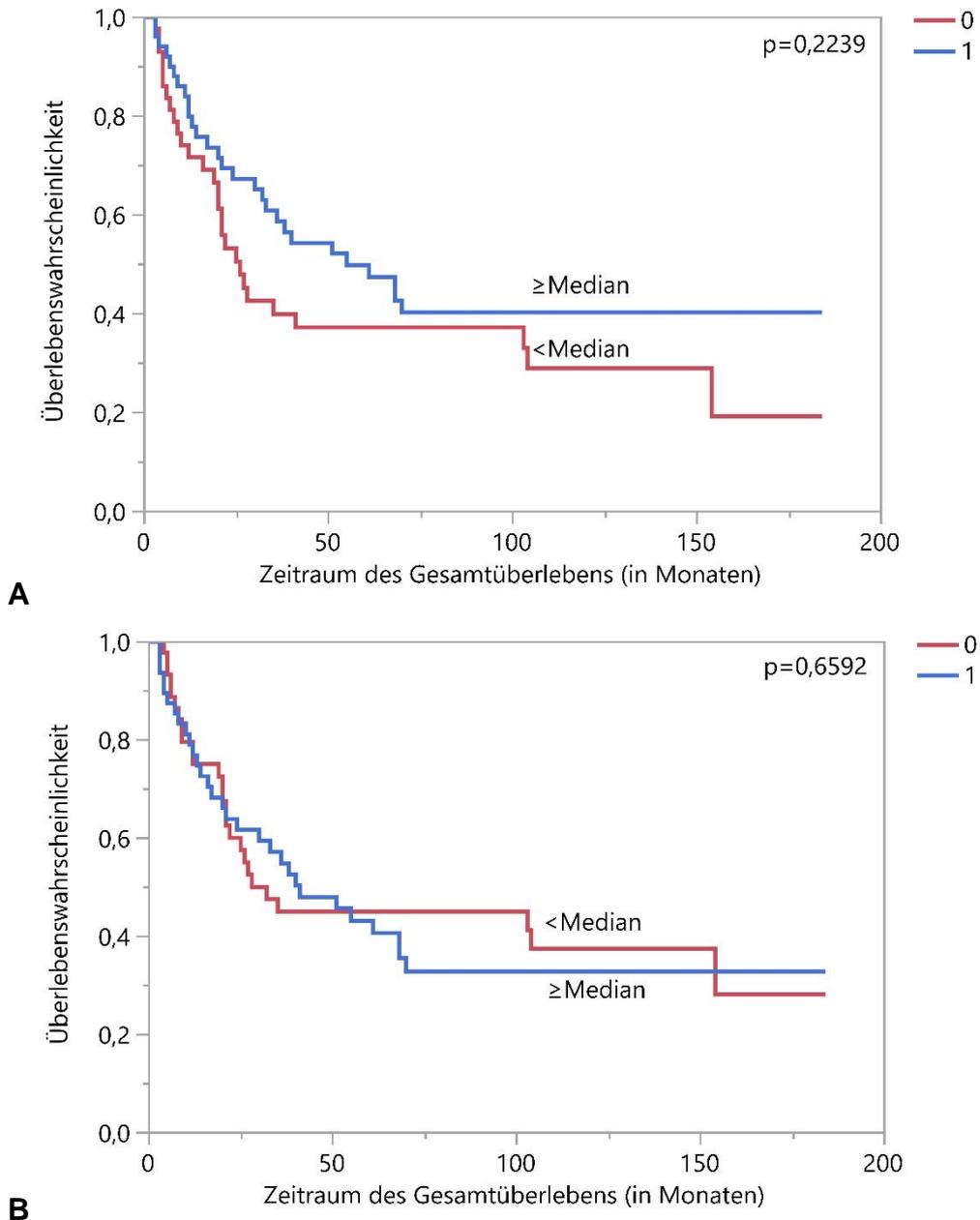


Abb.95: Zeitraum des Gesamtüberlebens in Monaten in Abhängigkeit der SSTR4-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,2239$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,6592$).
Jeweils Kaplan-Meier-Kurve. SSTR4-Expression 0 (rot) $<$ Median, 1 (blau) \geq Median. Median für SSTR4-Expression in Membranen 200, Median für SSTR4-Expression im Zytoplasma 180.

3.2.8.3.5 SSTR5

Für die membranständige und die zytoplasmatische SSTR5-Expression konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben festgestellt werden.

Ergebnisse

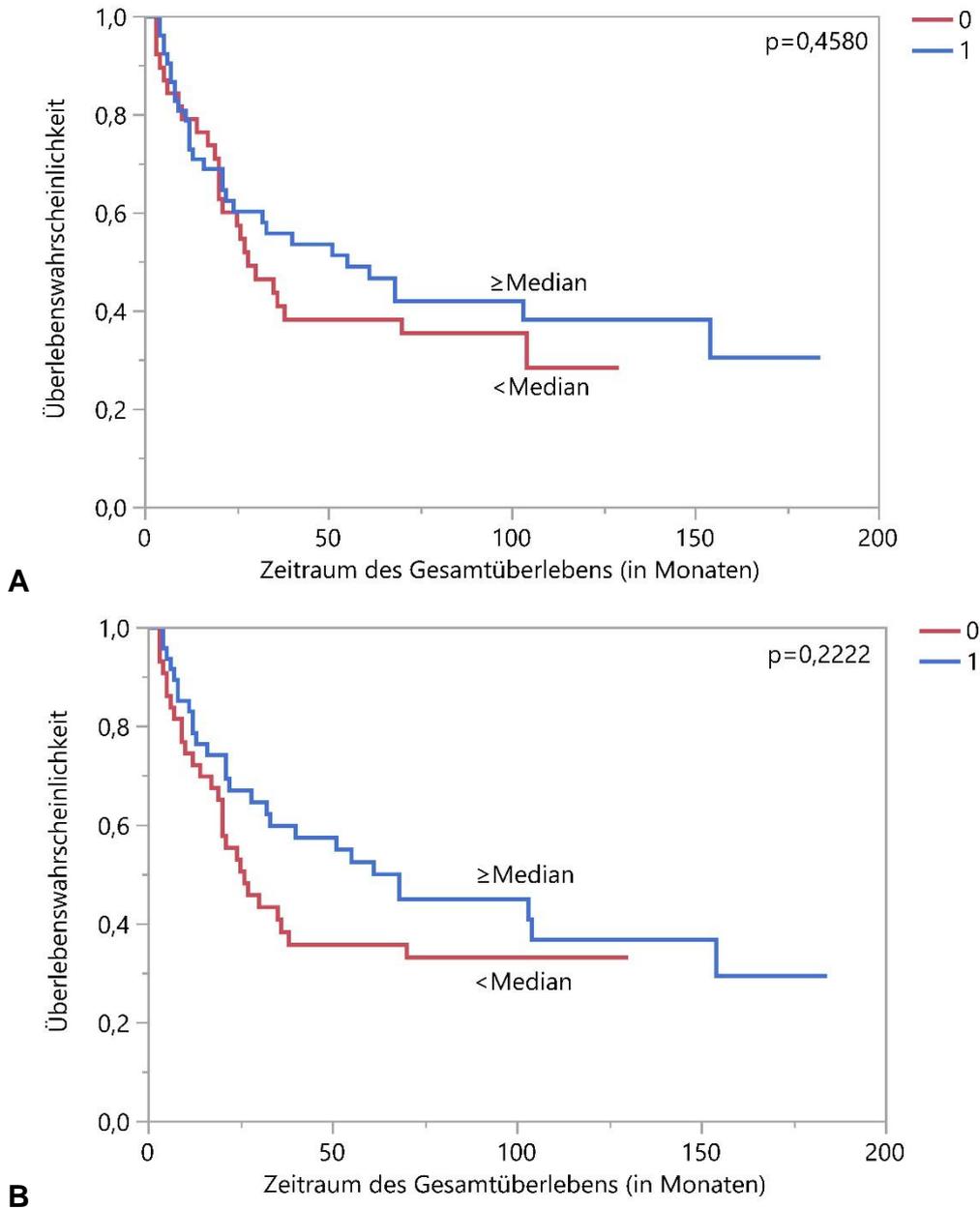


Abb.96: Zeitraum des Gesamtüberlebens in Monaten in Abhängigkeit der SSTR5-Expression in **(A)** Membranen des Tumorgewebes ($p=0,4580$) und **(B)** Zytoplasma des Tumorgewebes ($p=0,2222$).

Jeweils Kaplan-Meier-Kurve. SSTR5-Expression 0 (rot) < Median, 1 (blau) \geq Median. Median für SSTR5-Expression in Membranen 200, Median für SSTR5-Expression im Zytoplasma 180.

3.2.9 Univariate Analysen

In der univariaten Analyse wurde der Einfluss der Parameter T, N, M und SSTR1-5 jeweils einzeln auf die rezidivfreie Zeit, das tumorabhängige und das Gesamtüberleben getestet. Jeder der Parameter wurde abermals mittels des Medians dichotomisiert. Im Folgenden sind die Ergebnisse der einzelnen Regressionsanalysen dargestellt.

3.2.9.1 Rezidivfreie Zeit

In der univariaten Analyse konnte das T-Stadium ($p=0,0043$) als Einflussgröße auf die rezidivfreie Zeit nachgewiesen werden. Die SSTR-Expression scheint kein Prädiktor für das rezidivfreie Überleben zu sein (siehe Tab. 5).

Rezidivfreies Überleben	HR	95%-Konfidenzintervall	p-Wert
pT2 vs. pT3	3,25	1,42-8,77	0,0043*
N0 vs. N+	1,88	0,89-3,87	0,0948
M0 vs. M+	0,87	0,05-4,07	0,8872
SSTR1 < vs. \geq Median	0,52	0,24-1,19	0,1146
SSTR2 < vs. \geq Median	0,53	0,25-1,09	0,0821
SSTR3 < vs. \geq Median	0,56	0,27-1,15	0,1164
SSTR4 < vs. \geq Median	0,80	0,39-1,65	0,5333
SSTR5 < vs. \geq Median	0,92	0,45-1,91	0,8169

Tab. 5. Univariate Regressionsanalyse der relevanten klinischen Parameter und der SSTR-Expression für die rezidivfreie Zeit. SSTR jeweils dichotomisiert nach Median. Angabe der Hazard Ratio (HR), 95%-Konfidenzintervall und p-Wert. Signifikante p-Werte mit * markiert.

3.2.9.2 Tumorspezifisches Überleben

In der univariaten Analyse konnten die Tumorstadien T ($p=0,0062$), N ($p=0,0324$) und M ($p=0,0208$) als Prädiktor für das tumorspezifische Überleben festgestellt werden. Außerdem zeigte sich die Expression von SSTR3 als signifikanter Prädiktor für das CSS ($p=0,0316$, s. Tab. 6).

Ergebnisse

Tumorspezifisches Überleben (CSS)	HR	95%-Konfidenzintervall	p-Wert
pT2 vs. pT3	2,53	1,29-5,45	0,0062*
N0 vs. N+	1,96	1,06-3,63	0,0324*
M0 vs. M+	2,77	1,19-5,73	0,0208*
SSTR1 < vs. ≥Median	0,52	0,28-1,02	0,0561
SSTR2 < vs. ≥Median	0,67	0,37-1,22	0,1915
SSTR3 < vs. ≥Median	0,52	0,28-0,94	0,0316*
SSTR4 < vs. ≥Median	0,6	0,33-1,09	0,0926
SSTR5 < vs. ≥Median	0,99	0,54-1,84	0,9655

Tab. 6. Univariate Regressionsanalyse der relevanten klinischen Parameter und der SSTR-Expression für das tumorspezifische Überleben. SSTR jeweils dichotomisiert nach Median. Angabe der Hazard Ratio (HR), 95%-Konfidenzintervall und p-Wert. Signifikante p-Werte mit * markiert.

3.2.9.3 Gesamtüberleben

In der univariaten Analyse konnten die Tumorstadien T ($p=0,0008$), N ($p=0,0274$) und M ($p=0,0398$) als Prädiktor für das tumorspezifische Überleben festgestellt werden. Außerdem zeigte sich die Expression von SSTR2 ($p=0,0478$) und SSTR3 ($p=0,0044$) als signifikanter Prädiktor für das OS (siehe Tab.7).

Gesamtüberleben (OS)	HR	95%-Konfidenzintervall	p-Wert
pT2 vs. pT3	2,79	1,50-5,57	0,0008*
N0 vs. N+	1,85	1,07-3,17	0,0274*
M0 vs. M+	2,42	1,05-4,91	0,0398*
SSTR1 < vs. ≥Median	0,66	0,37-1,27	0,2051
SSTR2 < vs. ≥Median	0,58	0,33-0,99	0,0478*
SSTR3 < vs. ≥Median	0,46	0,26-0,79	0,0044*
SSTR4 < vs. ≥Median	0,72	0,43-1,23	0,2296
SSTR5 < vs. ≥Median	0,82	0,48-1,41	0,4631

Tab. 7. Univariate Regressionsanalyse der relevanten klinischen Parameter und der SSTR-Expression für das Gesamtüberleben. SSTR jeweils dichotomisiert nach Median. Angabe der Hazard Ratio (HR), 95%-Konfidenzintervall und p-Wert. Signifikante p-Werte mit * markiert.

3.2.10 Multivariate Analysen

Es folgten multivariate Analysen um festzustellen, ob die mit der SSTR-Expression nachgewiesenen Vorhersagen über den Krankheitsverlauf auch unabhängig von starken Prädiktoren auftreten. Als solch starke Prädiktoren konnten in der univariaten Analyse die Einflussgrößen T, N und M festgestellt werden.

3.2.10.1 Rezidivfreie Zeit

In der einfaktorischen Analyse konnte kein Einfluss der membranständigen SSTR-Expression auf die rezidivfreie Zeit nachgewiesen werden.

In der multivariaten Analyse konnte das T-Stadium als unabhängiger signifikanter Einfluss bestätigt werden ($p=0,0234$, $p=0,0122$, $p=0,0179$, $p=0,0280$). Ein solcher Nachweis gelang für das N-, M-Stadium und die SSTR-Expression nicht (siehe Tab. 8).

Ergebnisse

Rezidivfreies Überleben	HR	95%-Konfidenzintervall	p-Wert
pT2 vs. pT3	2,92	1,15-8,96	0,0234*
N0 vs. N+	1,8	0,81-3,94	0,1456
M0 vs. M+	1,39	0,08-7,16	0,7650
SSTR1 < vs. ≥ Median	0,59	0,26-1,42	0,2282
pT2 vs. pT3	2,29	0,95-6,35	0,0645
N0 vs. N+	1,72	0,78-3,76	0,1777
M0 vs. M+	1,20	0,07-6,05	0,8601
SSTR2 < vs. ≥ Median	0,7	0,31-1,51	0,3592
pT2 vs. pT3	3,14	1,26-9,5	0,0122*
N0 vs. N+	1,75	0,8-3,83	0,1632
M0 vs. M+	1,43	0,08-7,74	0,7461
SSTR3 < vs. ≥ Median	0,7	0,31-1,52	0,3614
pT2 vs. pT3	2,79	1,18-7,68	0,0179*
N0 vs. N+	1,62	0,73-3,52	0,2329
M0 vs. M+	1,18	0,06-6,02	0,8795
SSTR4 < vs. ≥ Median	0,87	0,40-1,92	0,7259
pT2 vs. pT3	2,62	1,10-7,23	0,0280*
N0 vs. N+	1,83	0,77-4,29	0,1699
M0 vs. M+	1,17	0,06-5,82	0,8839
SSTR5 < vs. ≥ Median	1,18	0,51-2,75	0,6982

Tab. 8: Multivariate Analyse der relevanten klinischen Parameter und der SSTR-Expression für das rezidivfreie Überleben. SSTR jeweils dichotomisiert nach Median. Angabe der Hazard Ratio (HR), 95%-Konfidenzintervall und p-Wert. Signifikante p-Werte mit * markiert.

3.2.10.2 Tumorspezifisches Überleben

In der einfaktoriellen Analyse konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von SSTR3 mit einem längeren tumorspezifischen Überleben einherging.

In der multivariaten Analyse konnte der Einfluss des T-, N- und M-Stadium als unabhängiger signifikanter Einflussfaktor bestätigt werden (T: $p=0,0421$; N: $p=0,0478$; M: $p=0,0271$, $p=0,0202$, $p=0,0467$).

Ebenso ließ sich der Einfluss der membranständigen SSTR3-Expression bestätigen ($p=0,0324$, s. Tab. 9).

Ergebnisse

CSS	HR	95%-Konfidenzintervall	p-Wert
pT2 vs. pT3	2,02	0,94-4,73	0,0731
N0 vs. N+	1,76	0,92-3,40	0,0870
M0 vs. M+	2,35	0,97-5,09	0,0569
SSTR1 < vs. ≥ Median	0,69	0,35-1,42	0,3066
pT2 vs. pT3	1,84	0,91-4,06	0,0933
N0 vs. N+	1,71	0,90-3,26	0,0989
M0 vs. M+	2,71	1,13-5,78	0,0271*
SSTR2 < vs. ≥ Median	0,66	0,35-1,25	0,2012
pT2 vs. pT3	2,14	1,03-4,91	0,0421*
N0 vs. N+	1,74	0,91-3,36	0,0949
M0 vs. M+	2,89	1,20-6,29	0,0202*
SSTR3 < vs. ≥ Median	0,50	0,26-0,94	0,0324*
pT2 vs. pT3	2,05	0,99-4,57	0,0525
N0 vs. N+	1,62	0,84-3,11	0,1482
M0 vs. M+	2,42	1,01-5,15	0,0467*
SSTR4 < vs. ≥ Median	0,69	0,36-1,28	0,2363
pT2 vs. pT3	1,93	0,94-4,30	0,0753
N0 vs. N+	1,98	1,01-3,93	0,0478*
M0 vs. M+	2,34	0,98-5,02	0,0558
SSTR5 < vs. ≥ Median	1,31	0,68-2,62	0,4225

Tab. 9. Multivariate Analyse der relevanten klinischen Parameter und der SSTR-Expression für das tumorspezifische Überleben (CSS). SSTR jeweils dichotomisiert nach Median. Angabe der Hazard Ratio (HR), 95%-Konfidenzintervall und p-Wert. Signifikante p-Werte mit * markiert.

3.2.10.3 Gesamtüberleben

In der einfaktoriellen Analyse konnte der Einfluss der Expression membranständiger SSTR2- und SSTR3-Rezeptoren auf das Gesamtüberleben

Ergebnisse

nachgewiesen werden. Patienten mit einer höheren Expression dieser SSTR-Subtypen lebten signifikant länger.

In der multivariaten Analyse konnte der Einfluss des T- und M-Stadiums als unabhängiger signifikanter Einflussfaktor bestätigt werden (T: $p=0,0099$, $p=0,0315$, $p=0,0098$, $p=0,0103$, $p=0,0116$; M: $p=0,0392$, $p=0,0290$).

Ebenso ließ sich der Einfluss der membranständigen SSTR3-Expression ($p=0,0076$) auf das Gesamtüberleben bestätigen.

Das N- Stadium und die SSTR2-Expression ließen sich nicht als unabhängige Prädiktoren bestätigen (siehe Tab. 10).

Ergebnisse

OS	HR	95%-Konfidenzintervall	p-Wert
pT2 vs. pT3	2,44	1,23-5,20	0,0099*
N0 vs. N+	1,72	0,97-3,05	0,0626
M0 vs. M+	2,18	0,92-4,59	0,0742
SSTR1 < vs. ≥ Median	0,90	0,48-1,77	0,7425
pT2 vs. pT3	2,03	1,06-4,16	0,0315*
N0 vs. N+	1,67	0,94-2,96	0,0794
M0 vs. M+	2,48	1,05-5,17	0,0392*
SSTR2 < vs. ≥ Median	0,61	0,34-1,07	0,0862
pT2 vs. pT3	2,37	1,22-4,98	0,0098*
N0 vs. N+	1,70	0,96-3,01	0,0710
M0 vs. M+	2,65	1,12-5,61	0,0290*
SSTR3 < vs. ≥ Median	0,46	0,26-0,82	0,0076*
pT2 vs. pT3	2,33	1,21-4,79	0,0103*
N0 vs. N+	1,61	0,91-2,86	0,1027
M0 vs. M+	2,14	0,91-4,43	0,0772
SSTR4 < vs. ≥ Median	0,77	0,44-1,34	0,3532
pT2 vs. pT3	2,30	1,20-4,73	0,0116*
N0 vs. N+	1,75	0,96-3,18	0,0669
M0 vs. M+	2,10	0,90-4,35	0,0842
SSTR5 < vs. ≥ Median	0,97	0,54-1,77	0,9306

Tab. 10. Multivariate Analyse der relevanten klinischen Parameter und der SSTR-Expression für das Gesamtüberleben (OS). SSTR jeweils dichotomisiert nach Median. Angabe der Hazard Ratio (HR), 95%-Konfidenzintervall und p-Wert. Signifikante p-Werte mit * markiert.

4 Diskussion

Die Expression von SSTR1-5 wurde bereits in vielen verschiedenen benignen und malignen Geweben nachgewiesen. Die immunhistochemische Evaluation der SSTR-Expression im muskelinvasiven Harnblasenkarzinom stand bislang noch aus.

Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis und die semiquantitative Bestimmung der SSTR1-5-Expression in muskelinfiltrierenden Harnblasenkarzinomen und im korrespondierenden benignen Urothel. Es wurde untersucht, welche SSTR-Subtypen exprimiert werden und in welchen subzellulären Segmenten. Außerdem sollten mögliche Expressionsunterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe und Muster von Co-Expressionen der SSTR-Subtypen untersucht werden. Anschließend wurde die Korrelation der SSTR-Expression mit dem TNM-Stadium, Grading, Alter und Geschlecht der Patienten untersucht. Zuletzt wurde die potenzielle prognostische Wertigkeit eruiert, indem die Korrelation zwischen der SSTR-Expression und der rezidivfreien Zeit, dem tumorspezifischen Überleben und dem Gesamtüberleben untersucht wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnten alle SSTR-Subtypen (1-5) in Tumor- und Normalgewebe immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Expression von SSTR1-4 zeigte sich signifikant vermindert in Tumor- im Vergleich zu Normalgewebe (p für alle $<0,002$), wohingegen sich die Expression von SSTR5 verstärkt zeigte ($p=0,0017$).

Die SSTR1-Expression zeigte sich bei einem niedrigeren T-Stadium ($<pT2a$) signifikant höher als bei Tumoren $\geq pT2a$ ($p=0,0477$).

Bezüglich der prognostischen Untersuchungen ergab sich eine längere rezidivfreie Zeit bei Patienten mit verstärkter SSTR1-Expression im Tumorgewebe ($p=0,0494$). Außerdem zeigten Patienten mit hoher SSTR1 und SSTR3 Expression ein signifikant längeres krebsspezifisches Überleben (CSS; $p=0,0411$ bzw. $0,0291$). In der multivariaten Analyse lies sich die membranständige SSTR3-Expression als unabhängiger Prädiktor für ein verlängertes tumorspezifisches Überleben bestätigen ($p=0,0324$). Patienten mit

Diskussion

hoher Expression von SSTR2 und 3 zeigten ein signifikant besseres Gesamtüberleben (OS; $p=0,0449$ bzw. $0,004$). Auch hier ließ sich die Expression von SSTR3 in der multivariaten Analyse als unabhängiger Prädiktor für das Gesamtüberleben bestätigen ($p=0,0076$).

In endokrin und neuroendokrin aktiven Tumoren wie NETs, beispielsweise pankreatische neuroendokrine Tumore, GEP-NET, ist die Überexpression von SSTR bereits gut untersucht. GEP-NET zeigen in 80-100% der Fälle eine SSTR-Expression (Reubi & Waser, 2003). Gut differenzierte Tumore exprimieren häufiger SSTR als schlecht differenzierte (Reubi, Kvols, et al., 1990). Die Expression ist dabei homogen auf die Tumorzellen verteilt, vorherrschend sind die Subtypen SSTR2, gefolgt von SSTR1 und SSTR5 (Reubi, 2004). Auch in nicht-neuroendokrinen Tumoren wie Kolon-, Brust-, Lungen- oder Prostatakarzinomen wurde eine SSTR-Expression bereits nachgewiesen (Evans et al., 1997; Iftikhar, Thomas, Rooney, & Morris, 1992; Moody, Ramos-Alvarez, & Jensen, 2018).

In der hier vorliegenden Studie zeigte sich die Expression von SSTR1-4 in Tumorgewebe signifikant erniedrigt im Vergleich zum Normalgewebe. Im Gegensatz dazu zeigte sich die SSTR5-Expression in Tumorgewebe signifikant erhöht.

SSTR-vermittelte Signalwege lösen antiproliferative Effekte aus und blockieren den Zellzyklus (Cheung & Boyages, 1995; Srikanth, 1995). Eine verminderte Expression von SSTR1-4 könnte der Evolution der Tumorzellen geschuldet sein, die auf diese Weise den hemmenden Einflüssen von Somatostatin auf den Zellzyklus entkommen und von Wachstumsvorteilen profitieren können (Bousquet, Puente, Buscail, Vaysse, & Susini, 2001).

Auch bei Prostata-, Kolorektal- und Pankreaskarzinomen wird von einer verminderten SSTR1-4-Expression berichtet (Buscail et al., 1996; Reubi, Waser, Schaer, & Markwalder, 1995).

Analog zu den anderen SSTR-Subtypen werden auch über SSTR5 antiproliferative Effekte vermittelt, was eine Deutung der gesteigerten SSTR5-Expression in Tumorgewebe im Vergleich zu benignem Gewebe erschwert. Auch eine kürzlich veröffentlichte Studie über Patienten mit Lungentumoren konnte

Diskussion

eine gesteigerte SSTR5-Expression in Adenokarzinomen, Plattenepithelkarzinomen und Kleinzelligen Lungenkarzinomen nachweisen, was auf eine mögliche onkogene und proliferationsfördernde Wirkung von SSTR5 hindeutet (Stumpf et al., 2018).

Einer ausführlichen Literaturrecherche zufolge gibt es lediglich eine Studie, die die SSTR-Expression im Harnblasenkarzinom untersuchte. Allerdings wurde die SSTR-Expression in dieser Studie mittels Analyse der mRNA-Expression von SSTR-Subtypen mit Reverser Transkriptase- Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und anschließender Gelelektrophorese untersucht (Karavitakis et al., 2014). Karavitakis et al. untersuchten 45 Gewebeproben (34 Tumorproben und 11 Normalgewebe), dabei konnten sie jedoch keine vermehrte oder verminderte Expression von SSTR1-4 im Vergleich von benignem und malignem Gewebe feststellen. Die Expression von SSTR5 konnte in 44 von 45 Proben nachgewiesen werden (33/34 Tumorproben und 11/11 Normalgewebe), was mit der signifikant erhöhten SSTR5-Expression in Membranen ($p=0,0017$) und Zytoplasma ($p<0,0001$) in Tumoren der vorliegenden Studie korreliert.

Mit einer Fallzahl von 37 Patienten wurde jedoch nur ein sehr kleines Patientenkollektiv untersucht. Hinzu kommt, dass lediglich 8 Gewebeproben das T-Stadium pT2 aufwiesen und damit den Einschlusskriterien dieser Arbeit entsprechen. Die Ergebnisse sind also nur sehr eingeschränkt vergleichbar. Dennoch stimmt die signifikant niedrigere SSTR3-Expression in Tumorgewebe im Vergleich zu Normalgewebe mit den hier vorliegenden Ergebnissen überein.

Die antitumorale Wirkung von Somatostatin wird über direkte und indirekte Mechanismen vermittelt. Während die indirekte Wirkung über Hemmung der endokrinen Wachstumsfaktorfreisetzung und -synthese und die Hemmung der Tumorangiogenese vermittelt wird, wird die direkte Wirkung in erster Linie über den Zellzyklusarrest an verschiedenen Stellen des Zellzyklus und die Apoptoseinduktion erreicht (Florio et al., 2003; Murray et al., 2004; Shimon et al., 1997).

Diskussion

Die Wirkung der SSTR-Subtypen zeigen viele Ähnlichkeiten. Jeder Rezeptor-Subtyp scheint für eine ganze Reihe an Effekten verantwortlich zu sein (Theodoropoulou & Stalla, 2013).

Einer der wichtigsten Signalwege ist die Aktivierung der Thyrosin-Phosphatase (PTP), die über SSTR1, 2, 4 und 5 einen Zellzyklusarrest am G1/S-Übergang oder über SSTR3 am G2/M-Übergang bewirkt (Cheung & Boyages, 1995; Sharma et al., 1996; Srikant, 1995). Über die Aktivierung der SSTR kann über SH2-haltige Phosphatase (SHP) auch eine Übersäuerung der Zelle induziert werden, was zu deren Apoptose führt (C. Y. Lin et al., 2003; X. Lin et al., 1996; Thangaraju et al., 1999). Die Apoptose einer Zelle wird ferner über eine Hochregulierung und Akkumulation des Tumorsuppressors p53 induziert, was durch Aktivierung von SSTR2 und SSTR3 ausgelöst werden kann (Buscail et al., 1996; Thangaraju et al., 1999; Theodoropoulou et al., 2006). Interessanterweise wurde die Aktivierung von BAX, SHP-1 und korrelierter aktivierter Caspase 8 lediglich für SSTR3 beschrieben, was auf eine wichtige Rolle von SSTR3 bei der Regulation der Apoptose schließen lässt (Liu et al., 2000; Sharma et al., 1996; Thangaraju et al., 1999). Zusammen mit der berichteten antiangiogenetischen Wirkung von SSTR3 könnte dies die unabhängige prognostische Rolle von SSTR3 erklären, die in unsere Studie beobachtet wurde (Albini et al., 1999; Florio et al., 2003).

Wie bereits zuvor erwähnt, wurde die SSTR-Überexpression zuerst in neuroendokrinen oder endokrin aktiven Tumoren beschrieben. Da uns keine Informationen zu molekularen Subtypen der in der vorliegenden Studie untersuchten Tumore vorliegen, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob bei Urothelkarzinomen mit neuroendokrinem Subtyp eine erhöhte Expression zu beobachten ist (Kamoun et al., 2019; Robertson et al., 2018).

Die Expression von SSTR1-5 konnte in unterschiedlichem Ausmaß in soliden Tumoren wie Lungentumoren, hepatozellulären Tumoren, cholangiozellulären Tumoren, Prostata- oder Brusttumoren nachgewiesen werden (Kaemmerer et al., 2017; Pedraza-Arevalo et al., 2017; Reubi, Waser, et al., 1990; Reubi et al., 1995; Stumpf et al., 2018).

Diskussion

Verschiedene Studien evaluierten das Potential der SST-Analoga Octeotrid und Lanreotid mit hoher Affinität zu SSTR2,3 und 5, konnten allerdings keine signifikanten Effekte auf diese Tumore feststellen (Hejna, Schmidinger, & Raderer, 2002).

Eine kürzlich veröffentlichte klinische Studie untersuchte die Wirkung des SSTA Pasireotid, das eine hohe Affinität zu mehreren SSTR hat, bei Patienten mit hepatozellulären Karzinomen. Es zeigte sich ein begrenzter klinischer Nutzen, für andere Entitäten wie Melanome (NCT01652547) wurden noch keine Ergebnisse veröffentlicht (Feun et al., 2018).

Die Expression von SSTR1-5 und die beobachteten Zusammenhänge mit der Prognose weisen auf die potenzielle Bedeutung von Multirezeptor-gerichteten SSTA bei Urothelkarzinomen hin.

Wie eingangs erwähnt, konnte in der hier vorliegenden Studie gezeigt werden, dass eine verstärkte SSTR1 und SSTR3-Expression mit einem verlängerten tumorspezifischen Überleben einherging. Die membranständige SSTR3-Expression konnte in der multivariaten Analyse als unabhängiger Prädiktor für ein verlängertes tumorspezifisches Überleben bestätigt werden ($p=0,0324$). Auch bezüglich des Gesamtüberlebens ging eine Überexpression von SSTR2 und SSTR3 mit einer besseren Prognose einher. Patienten mit einer verstärkten Expression dieser beiden Rezeptoren lebten länger. Die Expression von SSTR3 ließ sich als unabhängiger Prädiktor für das Gesamtüberleben bestätigen ($p=0,0076$).

In der klinischen Routine des Harnblasenkarzinoms stellen der individuell sehr unterschiedliche und nur schlecht vorhersehbare Verlauf ein großes Problem dar. Die Erkenntnisse dieser Studie können zu einer besseren Einschätzung des Rezidiv- und Progressionsverhaltens beitragen. Eine denkbare Ergänzung, um das Rezidiv- und Progressionsverhalten besser abschätzen zu können, wäre der Einsatz von molekularen Markern (Kim & Bae, 2008; Lotan et al., 2013).

Nach Definition des National Cancer Institutes ist ein Biomarker definiert als Substanz, die in Gewebe, Blut oder anderen Körperflüssigkeiten gefunden werden kann (Institute, 2019). Meistens wird sie von Normal- und Tumorgewebe sezerniert und unterscheidet sich lediglich in der Menge. Prognostische

Diskussion

Biomarker können helfen, die natürliche Entwicklung des Tumors vorherzusagen. Prädiktive Biomarker können helfen, den potenziellen Nutzen einer Behandlungsform abzuschätzen. Pharmakologische Biomarker können die Effektivität einer Chemotherapie und möglicherweise ihre optimale Dosierung einschätzen helfen.

Möglicherweise ist eine Einschätzung des Rezidiv- und Progressionsverhaltens des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms anhand der SSTR-Expression möglich.

In der logischen Konsequenz könnte dieses Wissen beispielsweise genutzt werden, um im Umkehrschluss Patienten mit einer geringen Expression der Subtypen 1-3 einer engmaschigeren Nachsorge zuzuführen.

Eine routinemäßige Anwendung von molekularen Markern in der Therapie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms erfolgt bislang noch nicht (Mohammed et al., 2016).

Alternativ könnte die in dieser Studie beschriebene SSTR5-Überexpression in muskelinvasiven Harnblasenkarzinomen als möglicher Angriffspunkt für die Therapie mit SST-Analoga dienen. Muskelinvasive Harnblasenkarzinome exprimierten, wie oben beschrieben, in ihren Membranen ($p=0,0017$) und Zytoplasmen ($p<0,0001$) signifikant mehr SSTR5 als Normalgewebe.

Auch in Karzinomen der Gallenblase konnte immunhistochemisch eine höhere SSTR5-Expression im Vergleich zum Normalgewebe nachgewiesen werden (Guo, Shi, Zhou, & Chen, 2013).

Karavitakis (2014) machte SSTR5 ebenfalls als vorherrschenden Subtyp in Blasengewebe, sowohl in Tumor- als auch im Normalgewebe, aus. Damit unterscheidet er sich ebenfalls von zahlreichen vorherigen Studien, die den SSTR-Subtyp 2 als prädominant in verschiedenen Tumorgeweben sahen (Theodoropoulou & Stalla, 2013; Weckbecker et al., 2003).

Auch beim muskelinvasiven Harnblasenkarzinom wäre unter Umständen eine Therapie mit SST-Konjugaten oder SST-Analoga beispielsweise als neoadjuvante oder adjuvante Therapie denkbar.

Octreotid und Lanreotid sind Beispiele für SST-Analoga und werden unter anderem bereits in der Behandlung der Akromegalie bzw.

Diskussion

Gastroenteropankreatischen Neuroendokrinen Tumoren (GEP-NET) eingesetzt (Faiss et al., 1999; Reubi et al., 1992). Aber auch eine Verbindung von potenten Chemotherapeutika wie Methotrexat (MTX), Paclitaxel (PTX) oder Camptothecin (CPT) mit SST-Analoga ist möglich (Sun & Coy, 2011). SSTA können Chemotherapeutika zielgerichtet in SSTR-überexprimierende Tumorgewebe überbringen und damit systemische Nebenwirkungen reduzieren (Kwekkeboom, Krenning, & de Jong, 2000). SSTR5 könnte dabei als Angriffspunkt für Therapien nach diesen Vorbildern dienen. Bei GEP-NET wird unter SSTA-Hochdosis-Therapie mit Lanreotid von antiproliferativen Effekten, Besserung der Symptome und in einzelnen Fällen gar von einer Regression berichtet (Faiss et al., 1999).

Es sind mehrere Theorien denkbar, die die oben beschriebene positive Korrelation zwischen SSTR-Expression und verlängertem tumorspezifischen bzw. Gesamtüberleben erklären könnten.

In der hier vorliegenden Arbeit ging, gemessen am T-Stadium, eine vermehrte SSTR1-Expression in Membranen ($p=0,0477$) und Zytoplasmen ($p=0,0424$) mit einer weniger invasiven und infiltrativen Erkrankung einher.

Auch Papotti stellte eine inverse Korrelation von SSTR-Hochregulation und Tumoraggressivität fest- er hatte dies für die SSTR2-Expression in neuroendokrinen Tumoren der Lunge festgestellt (Papotti et al., 2000).

Es wurde in mehreren Studien bereits gezeigt, dass über alle SSTR-Subtypen ein Zellzyklusarrest an verschiedenen Stellen des Zellzyklus vermittelt werden kann. Auf diese Weise wirkt SST direkt zytostatisch an Tumorzellen (Cheung & Boyages, 1995; Sharma et al., 1996; Srikant, 1995).

Im Umkehrschluss ist es möglich, dass das physiologische Somatostatin seine antiangiogenetische, proliferationshemmende und apoptoseinduzierende Wirkung bei Verlust der SSTR nicht mehr entfalten kann und somit die Tumorgenese, Tiefeninfiltration und Zellproliferation beschleunigt, verstärkt oder gar erst in Gang setzt. Dies würde erklären, dass eine verminderte SSTR1-3-Expression mit einem verkürzten tumorspezifischen bzw. Gesamtüberleben einhergeht. Durch die fehlenden Rezeptoren in Tumorgewebe kann Somatostatin

Diskussion

seine physiologische Wirkung möglicherweise nicht mehr voll entfalten und es kommt zu schwereren Verläufen.

Mit dem neuen Wissen um die Expression bzw. teilweisen Überexpression der untersuchten Marker im Gewebe des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms könnten auf diese Weise neue oder ergänzende Therapien auf den Weg gebracht werden.

Vorausgesetzt, dass sich in präklinischen Studien die SSTR-vermittelten Effekte vielversprechend zeigen, könnte in einem nächsten Schritt das Potential von SSTA in Kombination mit etablierten Chemo- oder Immuntherapien des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms evaluiert werden, analog zu Ansätzen bei medullären Schilddrüsenkarzinomen (Faggiano et al., 2018).

In der systemischen Therapie des Harnblasenkarzinoms kommt als Standard Erstlinien-Therapie bisher das GC-Schema (Gemcitabin und Cisplatin) oder M-VAC-Schema (Methotrexat, Vinblastin, Adriamycin, Cisplatin) zum Einsatz, alternativ carboplatinhaltige Schemata (Stenzl et al., 2012). Künftig sind möglicherweise Konjugate mit SSTA denkbar, um Überexprimierte SSTR in Tumorgeweben direkt anzusteuern.

Da die SSTR-Expression in verschiedenen Gewebetypen physiologisch vorzukommen scheint, sollte ein diagnostischer und therapeutischer Ansatz mit Konjugaten aus SSTA und Wirkstoff (radioaktiv markiert oder nicht) derzeit kritisch diskutiert werden.

Eine Untersuchung der SSTR-Expression in neuroendokrin differenzierten Harnblasenkarzinomen wäre sehr interessant. Ein therapeutischer Einsatz von Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten wäre bei dieser besonders aggressiven Tumorform denkbar. Bei Patienten mit metastasiertem NET verlängerte die Gabe von ⁹⁰Y-labeled (DOTA)-Tyr³-Octreotrid (⁹⁰Y-DOTATOC) das Überleben (Filippi, Ciorra, Sardella, Schillaci, & Bagni, 2014; Frilling et al., 2006).

Selbst in der Therapie des SSTR-negativen nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) konnten an Mäusen erste Erfolge verbucht werden: Die Tumorgefäße

Diskussion

zeigten sich SSTR-positiv und konnten von einem SSTA-Doxorubicin-Konjugat angesteuert und in der Proliferation gehemmt werden (Szereday et al., 2003).

In ersten Versuchen zeigte sich auch das Konjugat eines SSTA mit CPT als vielversprechender Vektor in der Therapie des Prostatakarzinoms (Sun, Luo, Mackey, Fuselier, & Coy, 2007).

Ein Vorteil ist die lokal höhere Konzentration von Chemotherapeutika bzw. Radionukliden im Tumor und die damit höhere Effektivität. Gleichzeitig ist eine gute Verträglichkeit bei geringeren systemischen Nebenwirkungen denkbar.

Das Wissen um die Wirkung von SST wird bereits vielseitig genutzt. So gilt die Bildgebung mittels SSTR-Szintigraphie (SRI) seit Jahren als Goldstandard zum Nachweis rezeptorpositiver GEP-NET oder Metastasen, auch <1cm (Gibril et al., 1996).

Auch in der Detektion anderer Tumore wurden verschiedene Studien durchgeführt. Beim primären Mammakarzinom gelang mit der SSTR-Szintigraphie der Nachweis in 75% der Fälle (van Eijck et al., 1994).

Ein positiver Nebeneffekt ist dabei, dass im selben Schritt Patienten selektiert werden können, die einer möglichen SSTA-Therapie zugeführt werden können. Patienten mit einer starken Anreicherung in der SRI, also einer starken SSTR-Expression scheinen von einer SSTA-Therapie zu profitieren.

Auch in der Detektion des Harnblasenkarzinoms ist eine SSTR-orientierte Bildgebung denkbar. Die oben beschriebene Überexpression von SSTR5 in Tumorgewebe scheint ein möglicher Zielpunkt für die SRI. Ergänzend können mit Hilfe der SRI Patienten mit sehr starker SSTR-Überexpression in den urothelialen Tumorzellen auffindig gemacht werden. Sie könnten möglicherweise von einer SSTA-Therapie profitieren. Octreotid mit seiner starken Affinität zu SSTR5 scheint dafür besonders gut geeignet zu sein (Lamberts, van der Lely, de Herder, & Hofland, 1996).

Weitere Studien sind anzustreben, um die oben genannten Widersprüche aufzuklären und die Rolle der SSTR in der Pathophysiologie des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms weiter zu verstehen und zu validieren.

Diskussion

Kritisch betrachtet können folgende limitierende Faktoren dieser Studie ausgemacht werden: Aufgrund der Ausschlusskriterien wurden keine Patienten in die Studie aufgenommen, deren Tumorstadium kleiner als T2a war. Folglich können in der vorliegenden Arbeit keine Aussagen getroffen werden zu nicht-invasiven papillären Karzinomen und Tumoren, die lediglich die Lamina propria infiltrieren.

Trotz der hohen Anzahl an untersuchten Einzelproben lässt auch die Größe des Kollektivs mit 103 untersuchten Patienten eine nur eingeschränkte Verallgemeinerung der Ergebnisse zu. Außerdem war die Stichprobe auf Deutschland, bzw. auf Patienten aus Tübingen, beschränkt und ist damit nicht zwangsläufig repräsentativ für die Gesamtpopulation.

Eine weitere Studie, die Tumorstadien kleiner T2a miteinbezieht und ein größeres Patientenkollektiv untersucht, wäre anzustreben.

Weitere Einschränkungen ergeben sich aus dem retrospektiven Charakter dieser Studie. Einflussgrößen werden oftmals unterschätzt oder trotz großer Sorgfalt bei der Erhebung der Daten in der rückblickenden Befragung der Patienten nicht mehr korrekt erinnert.

Da das Patientenkollektiv nicht randomisiert ist, kann es außerdem zur Stichprobenverzerrung kommen (Sessler & Imrey, 2015).

Eine prospektive Studie mit einer randomisierten kontrollierten Patientengruppe ist am besten geeignet, die vorliegenden Ergebnisse zu validieren und sollte in naher Zukunft erfolgen.

Das Verfahren der Tissue Microarrays (TMA) ermöglicht die gleichzeitige standardisierte und ökonomische Untersuchung einer großen Anzahl von Geweben und bietet damit viele Vorteile. Allerdings gibt es auch folgende Punkte zu beachten: Herstellungsbedingt kann es durch unvollständige und somit nicht auswertbare Gewebestanzen zu einer Minderung der Stichprobengröße kommen. Ebenso trägt das Abschwimmen der Stanzen vor der Fixierung auf dem Objektträger zur Minderung der Stichprobengröße bei, wenn eine eindeutige Zuordnung der Stanzen nicht mehr gewährleistet ist.

Diskussion

Die Validierung der Ergebnisse sollte, eventuell auch mit anderen Methoden wie der in situ Hybridisierung der DNA oder RNA oder der Nachweis von RNA bzw. DNA mittels PCR, erfolgen.

Für potenziell intratumoral heterogenes Gewebe wird berichtet, dass eine einzelne Stanze nicht zwangsläufig repräsentativ für den gesamten Tumor sein muss (Merseburger et al., 2006).

Das benigne Urothel wurde aus tumorfreien Bereichen der Tumorgewebeblöcke gestanzt. Unter Umständen sind andere Ergebnisse bei komplett tumorfreien Patienten zu erwarten.

Um den oben genannten Problemen zu begegnen wurden in der vorliegenden Arbeit pro benignem Urothel und Tumorgewebe jeweils bis zu drei Stenzen entnommen. So wurden mehrere Areale des Tumors bzw. benignem Gewebe abgedeckt und verblindet ausgewertet.

Für künftige Studien könnten Proben des Normalgewebes von tumorfreien Patienten gewonnen werden.

Ein weiterer Punkt ist, dass die immunhistochemische Auswertung semiquantitativ erfolgte, was erfahrungsgemäß stark untersucherabhängig ist. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen wurde darauf geachtet, die Daten bei gleichbleibender Lichtintensität und Bildschirmeinstellungen zu erheben.

In mehreren Studien konnte aber bereits gezeigt werden, dass Ergebnisse, die über die Proteinexpression, also immunhistochemisch, gewonnen wurden gut mit Ergebnissen der RT-PCR, also dem mRNA-Nachweis von SSTR, vergleichbar waren (Mizutani et al., 2012; Papotti et al., 2000).

Für künftige Studien könnte angestrebt werden, die Proben von verschiedenen Untersuchern unabhängig voneinander auswerten zu lassen und die Ergebnisse zu mitteln.

5 Zusammenfassung

Das Harnblasenkarzinom zählt weltweit zu den häufigsten malignen Tumorerkrankungen. Dennoch stellen die Diagnose, Therapie und die Prognose des klinisch interindividuell sehr unterschiedlichen Verlaufs nach wie vor eine Herausforderung dar. Dabei kann die Entwicklung neuer Biomarker Abhilfe schaffen. Es wurde bereits nachgewiesen, dass das Neuropeptid Somatostatin direkten und indirekten Einfluss auf Tumor- und Normalgewebe nimmt. Der Einsatz von SSTR als potentielle molekulare Marker für die Diagnose, Therapie und Prognose des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms ist denkbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig mittels der Tissue Microarray-Technik immunhistochemisch sowohl die membranständige als auch die zytoplasmatische Expression der SSTR-Subtypen 1 bis 5 in Normal- und Tumorgewebe erfasst. Zugrunde lag ein Patientenkollektiv, das 103 Patienten erfasste, die sich an der Klinik für Urologie in Tübingen einer Zystektomie unterzogen. Das mediane Alter betrug 69 Jahre, darunter waren 79 männliche und 24 weibliche Patienten. Zur Beurteilung der membranösen und zytoplasmatischen Expression der Rezeptoren erfolgte die Herstellung eines Tissue Microarrays und anschließende immunhistochemische Färbung. Anschließend wurden die erhobenen Daten den klinischen Daten und dem Krankheitsverlauf gegenübergestellt.

Es konnten alle SSTR-Subtypen (1-5) in Tumor- und Normalgewebe immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die membranöse Expression von SSTR1-4 zeigte sich im Gewebe des muskelinvasiven Harnblasenkarzinoms signifikant vermindert im Vergleich zu benignem Urothel (p für alle $<0,002$). Ebenso war die Färbung des Zellplasmas bei SSTR1 und SSTR3 in Normalgewebe verstärkt ($p=0,0016$ und $p<0,0001$). Interessanterweise zeigte sich dagegen die Expression von SSTR5 in Membranen und Zytoplasmen des Tumorgewebes im Vergleich zu benignem Urothel verstärkt ($p=0,0017$ und $p<0,0001$).

Zusammenfassung

Eine starke Expression von SSTR1 war assoziiert mit einem niedrigeren T-Stadium, sowohl in der membranösen ($p=0,0477$) als auch der zytoplasmatischen ($p=0,0424$) Färbung. Es konnte keine Korrelation zwischen der Expression von SSTR1-5 und N- bzw. M-Status beobachtet werden. Einen Zusammenhang zwischen Geschlecht und SSTR-Expression konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

In der univariaten Analyse konnten die Tumorstadien T, N und M als Prädiktoren für die rezidivfreie Zeit und das tumorspezifische bzw. das Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Außerdem zeigten Patienten mit hoher SSTR3-Expression ein signifikant längeres tumorspezifisches Überleben (CSS, $p=0,0316$). In der multivariaten Analyse bestätigte sich die Expression von SSTR3 als unabhängiger Marker in Bezug auf ein verbessertes CSS ($p=0,0462$). Patienten mit hoher Expression von SSTR2 und 3 zeigten außerdem in der univariaten ($p=0,0449$, $p=0,004$) sowie der multivariaten Analyse ($p=0,0101$, $p=0,0390$) ein signifikant besseres Gesamtüberleben.

Die Untersuchung der Korrelation der SSTR-Subtypen miteinander in Membranen des Tumorgewebes ergab folgendes: Je höher die Expression von SSTR1, desto höher auch die Expression von SSTR2 ($p=0,0069$), SSTR3 ($p=0,0001$), SSTR4 ($p=0,0001$) und SSTR5 ($p=0,0012$). Je mehr SSTR2 exprimiert wurde, desto mehr SSTR3 wurde auch exprimiert ($p<0,0001$). Auch die Subtypen 3 und 4 korrelierten positiv miteinander ($p=0,0036$).

Die Untersuchung der Korrelation der zytoplasmatischen SSTR-Subtypen untereinander im Tumorgewebe ergab folgendes: Je höher die Expression von SSTR1, desto höher war auch die Expression von SSTR2 ($p=0,0001$), SSTR3 ($p=0,0001$), SSTR4 ($p=0,0001$), SSTR5 ($p=0,0002$). Je mehr SSTR2 exprimiert wurde, desto mehr SSTR3 ($p=0,0001$) beziehungsweise SSTR5 ($p=0,0057$) wurde auch exprimiert. Bei hoher SSTR3-Expression wurde auch mehr SSTR4 exprimiert ($p=0,0233$).

Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass SSTR1-5, entweder einzeln oder in Kombination, einen Beitrag zur Diagnose, Therapie und Prognose

Zusammenfassung

des Harnblasenkarzinoms leisten könnten. Die Überexpression von SSTR5 in Tumorgewebe im Vergleich zu normalem Urothel könnte eine potenzielle Angriffsstelle in der rezeptorgerichteten Therapie mit Somatostatin-Analoga darstellen und verdient weitergehende Untersuchungen. Insbesondere SSTR2 und SSTR3 können als Indikator für eine verbesserte Prognose bei Patienten mit muskelinvasivem Harnblasenkarzinom gesehen werden. Aktuelle vorklinische Studien zum Einfluss von Somatostatin-Analoga wie Octreotid auf das Wachstum von Blasenkrebs werden durch die hier vorliegenden Ergebnisse unterstützt.

6 Anhang

Abkürzungen

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AG	Antigen
AK	Antikörper
ALA	Aminolävulinsäure
<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i>
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
bzw.	beziehungsweise
<i>CIS</i>	<i>Carcinoma in situ</i>
CPT	Camptothecin
CRPC	kastrationsresistentes Prostatakarzinom
CSS	cancer specific survival, krebsspezifisches Überleben
CT	Computertomograph
d.h.	das heißt
EAU	European Association of Urology
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Fa.	Firma
g	Gramm
GEP-NET	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore
GH	Growth Hormone, Wachstumshormon
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Hour, Stunde
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
Her2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-like growth factor

Anhang

IHC	Immunhistochemie
incl.	inclusive
LTP	Langzeitpotenzierung
max.	maximal
ml	Milliliter
mM	Millimol
M-Status	Metastasenstatus
MTX	Methotrexat
n	Grundgesamtheit
NAT	N-Acetyltransferase
neg.	negativ
NHE1	Na ⁺ /H ⁺ Austauscher
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
N-Status	Lymphknotenstatus
o.g.	oben genannt
OP	Operation
OS	overall survival, Gesamtüberleben
p53	Tumorsuppressor
PDD	Photodynamische Diagnostik
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PTP	Thyrosin-Phosphatase
PTX	Paclitaxel
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
R-Status	Resektionsstatus
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SHP-1	Tyrosin-Phosphatase
sog.	sogenannt
SRI	Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie

Anhang

SST	Somatostatin
SSTA	Somatostatin-Analoga
SSTR	Somatostatin-Rezeptor
Tab.	Tabelle
TMA	Tissue Mikroarray
TNM	Tumor, Nodes, Metastasen
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
T-Status	Tumor, Ausdehnung des Primärtumors
TUR	Transurethrale Resektion
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs.	versus
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

Danksagung

Zuerst möchte ich dem Ärztlichen Direktor der Urologischen Klinik, Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl, sowie Herrn Prof. Dr. med. Todenhöfer als betreuendem Doktorvater für die freundliche Überlassung des Themas und die für die Durchführung der Arbeit benötigten Hilfsmittel danken. Danke auch an Herrn Prof. Dr. med. Todenhöfer für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung, der Gestaltung der gesamten Dissertation und der Literatursuche.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter für die fachkundige und engagierte Betreuung dieser Arbeit. Als erste Anlaufstelle konnte er stets kompetent und konstruktiv unter hohem persönlichem Einsatz die ein oder andere Untiefe umschiffen. Auch Herrn Dr. med. Jan Moritz Maas bin ich zu großem Dank verpflichtet- für das beispiellose Durchhaltevermögen, die Aufmunterungen und die ausgesprochen konstruktive Zusammenarbeit.

Danke auch an Dr. med. Marcus Scharpf aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Tübingen für die Hilfestellung und Beratung beim Digitalisieren und Auswerten der Präparate.

Ein großes Dankeschön auch an das ganze Team des urologischen Labors für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Insbesondere sei hier Frau Ursula Kühs hervorgehoben, die mir in methodischen Fragen und beim Erstellen der immunhistochemischen Färbungen eine große Hilfe war. Danke auch an Herrn Julian Heinkele für die Hilfe beim Erstellen des Tissue Microarrays.

Mein allergrößter Dank gilt zu guter Letzt meinem Ehemann Timo Mayer, meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden. Eure Liebe, Unterstützung und Rückhalt sind mir die größte Motivation.

Literaturverzeichnis

- Aben, K. K., Witjes, J. A., Schoenberg, M. P., Hulsbergen-van de Kaa, C., Verbeek, A. L., & Kiemeny, L. A. (2002). Familial aggregation of urothelial cell carcinoma. *Int J Cancer*, *98*(2), 274-278.
- Adams, R. L., Adams, I. P., Lindow, S. W., Zhong, W., & Atkin, S. L. (2005). Somatostatin receptors 2 and 5 are preferentially expressed in proliferating endothelium. *Br J Cancer*, *92*(8), 1493-1498. doi:10.1038/sj.bjc.6602503
- Albini, A., Florio, T., Giunciuglio, D., Masiello, L., Carlone, S., Corsaro, A., . . . Schettini, G. (1999). Somatostatin controls Kaposi's sarcoma tumor growth through inhibition of angiogenesis. *Faseb j*, *13*(6), 647-655. doi:10.1096/fasebj.13.6.647
- Babjuk, M., Burger, M., Zigeuner, R., Shariat, S. F., van Rhijn, B. W., Comperat, E., . . . European Association of, U. (2013). EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol*, *64*(4), 639-653. doi:10.1016/j.eururo.2013.06.003
- Balar, A. V., Galsky, M. D., Rosenberg, J. E., Powles, T., Petrylak, D. P., Bellmunt, J., . . . Bajorin, D. F. (2017). Atezolizumab as first-line treatment in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*, *389*(10064), 67-76. doi:10.1016/s0140-6736(16)32455-2
- Bellmunt, J., Fougeray, R., Rosenberg, J. E., von der Maase, H., Schutz, F. A., Salhi, Y., . . . Choueiri, T. K. (2013). Long-term survival results of a randomized phase III trial of vinflunine plus best supportive care versus best supportive care alone in advanced urothelial carcinoma patients after failure of platinum-based chemotherapy. *Ann Oncol*, *24*(6), 1466-1472. doi:10.1093/annonc/mdt007
- Besser, G. M., Mortimer, C. H., McNeilly, A. S., Thorner, M. O., Batistoni, G. A., Bloom, S. R., . . . Schally, A. V. (1974). Long-term infusion of growth hormone release inhibiting hormone in acromegaly: effects on pituitary and pancreatic hormones. *Br Med J*, *4*(5945), 622-627.
- Bloom, S. R., Mortimer, C. H., Thorner, M. O., Besser, G. M., Hall, R., Gomez-Pan, A., . . . Schally, A. V. (1974). Inhibition of gastrin and gastric-acid secretion by growth-hormone release-inhibiting hormone. *Lancet*, *2*(7889), 1106-1109.
- Bocci, G., Culler, M. D., Fioravanti, A., Orlandi, P., Fasciani, A., Colucci, R., . . . Del Tacca, M. (2007). In vitro antiangiogenic activity of selective somatostatin subtype-1 receptor agonists. *Eur J Clin Invest*, *37*(9), 700-708. doi:10.1111/j.1365-2362.2007.01848.x
- Bolenz, C., & Lotan, Y. (2008). Molecular biomarkers for urothelial carcinoma of the bladder: challenges in clinical use. *Nat Clin Pract Urol*, *5*(12), 676-685. doi:10.1038/ncpuro1259
- Bousquet, C., Puente, E., Buscail, L., Vaysse, N., & Susini, C. (2001). Antiproliferative effect of somatostatin and analogs. *Chemotherapy*, *47* Suppl 2, 30-39. doi:10.1159/000049159
- Braunschweig, T., Chung, J. Y., & Hewitt, S. M. (2004). Perspectives in tissue microarrays. *Comb Chem High Throughput Screen*, *7*(6), 575-585.

- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., & Guillemin, R. (1973). Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science*, *179*(4068), 77-79.
- Burger, M., Catto, J. W., Dalbagni, G., Grossman, H. B., Herr, H., Karakiewicz, P., . . . Lotan, Y. (2013). Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer. *Eur Urol*, *63*(2), 234-241. doi:10.1016/j.eururo.2012.07.033
- Buscail, L., Saint-Laurent, N., Chastre, E., Vaillant, J. C., Gespach, C., Capella, G., . . . Susini, C. (1996). Loss of sst2 somatostatin receptor gene expression in human pancreatic and colorectal cancer. *Cancer Res*, *56*(8), 1823-1827.
- Cascinu, S., Del Ferro, E., Ligi, M., Staccioli, M. P., Giordani, P., Catalano, V., . . . Catalano, G. (2001). Inhibition of vascular endothelial growth factor by octreotide in colorectal cancer patients. *Cancer Invest*, *19*(1), 8-12.
- Cheung, N. W., & Boyages, S. C. (1995). Somatostatin-14 and its analog octreotide exert a cytostatic effect on GH3 rat pituitary tumor cell proliferation via a transient G0/G1 cell cycle block. *Endocrinology*, *136*(10), 4174-4181. doi:10.1210/endo.136.10.7664634
- Coons, A. H., Creech, Hugh J., Jones, R. Norman. (1941). Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Proc Soc Exp Biol Med* *47*, 200-2002.
- Cox, D. (1972). Regression models and life tables. *Journal of the Royal Statistical Society B*, (34): 187-220.
- Dash, A., Galsky, M. D., Vickers, A. J., Serio, A. M., Koppie, T. M., Dalbagni, G., & Bochner, B. H. (2006). Impact of renal impairment on eligibility for adjuvant cisplatin-based chemotherapy in patients with urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer*, *107*(3), 506-513. doi:10.1002/cncr.22031
- Evans, A. A., Crook, T., Laws, S. A., Gough, A. C., Royle, G. T., & Primrose, J. N. (1997). Analysis of somatostatin receptor subtype mRNA expression in human breast cancer. *Br J Cancer*, *75*(6), 798-803. doi:10.1038/bjc.1997.143
- Faggiano, A., Modica, R., Severino, R., Camera, L., Fonti, R., Del Prete, M., . . . Colao, A. (2018). The antiproliferative effect of pasireotide LAR alone and in combination with everolimus in patients with medullary thyroid cancer: a single-center, open-label, phase II, proof-of-concept study. *Endocrine*, *62*(1), 46-56. doi:10.1007/s12020-018-1583-7
- Faiss, S., Rath, U., Mansmann, U., Caird, D., Clemens, N., Riecken, E. O., & Wiedenmann, B. (1999). Ultra-high-dose lanreotide treatment in patients with metastatic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors. *Digestion*, *60*(5), 469-476. doi:7693
- Fan, W., & Fu, T. (2014). Somatostatin modulates LTP in hippocampal CA1 pyramidal neurons: differential activation conditions in apical and basal dendrites. *Neurosci Lett*, *561*, 1-6. doi:10.1016/j.neulet.2013.12.025
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J. W., Comber, H., . . . Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, *49*(6), 1374-1403. doi:10.1016/j.ejca.2012.12.027

- Feun, L. G., Wangpaichitr, M., Li, Y. Y., Kwon, D., Richman, S. P., Hosein, P. J., & Savaraj, N. (2018). Phase II trial of SOM230 (pasireotide LAR) in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *J Hepatocell Carcinoma*, 5, 9-15. doi:10.2147/jhc.S153672
- Filippi, L., Ciorra, A., Sardella, B., Schillaci, O., & Bagni, O. (2014). Sequential Use of (90)Y Microspheres Radioembolization and (177)Lu-Dotatate in Pluri-Metastatic Neuroendocrine Tumors: A Case Report. *Nucl Med Mol Imaging*, 48(4), 321-325. doi:10.1007/s13139-014-0292-2
- Fischer, T., Doll, C., Jacobs, S., Kolodziej, A., Stumm, R., & Schulz, S. (2008). Reassessment of sst2 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-1. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(11), 4519-4524. doi:10.1210/jc.2008-1063
- Florio, T., Morini, M., Villa, V., Arena, S., Corsaro, A., Thellung, S., . . . Albini, A. (2003). Somatostatin inhibits tumor angiogenesis and growth via somatostatin receptor-3-mediated regulation of endothelial nitric oxide synthase and mitogen-activated protein kinase activities. *Endocrinology*, 144(4), 1574-1584. doi:10.1210/en.2002-220949
- Frilling, A., Weber, F., Saner, F., Bockisch, A., Hofmann, M., Mueller-Brand, J., & Broelsch, C. E. (2006). Treatment with (90)Y- and (177)Lu-DOTATOC in patients with metastatic neuroendocrine tumors. *Surgery*, 140(6), 968-976; discussion 976-967. doi:10.1016/j.surg.2006.07.030
- Garcia-Closas, M., Malats, N., Silverman, D., Dosemeci, M., Kogevinas, M., Hein, D. W., . . . Rothman, N. (2005). NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet*, 366(9486), 649-659. doi:10.1016/S0140-6736(05)67137-1
- Gibril, F., Reynolds, J. C., Doppman, J. L., Chen, C. C., Venzon, D. J., Termanini, B., . . . Jensen, R. T. (1996). Somatostatin receptor scintigraphy: its sensitivity compared with that of other imaging methods in detecting primary and metastatic gastrinomas. A prospective study. *Ann Intern Med*, 125(1), 26-34.
- Guesdon, J. L., Ternynck, T., & Avrameas, S. (1979). The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem*, 27(8), 1131-1139.
- Guillemet-Guibert, J., Lahlou, H., Cordelier, P., Bousquet, C., Pyronnet, S., & Susini, C. (2005). Physiology of somatostatin receptors. *J Endocrinol Invest*, 28(11 Suppl International), 5-9.
- Guo, R. S., Shi, P. D., Zhou, J., & Chen, Y. Y. (2013). Somatostatin receptors 3, 4 and 5 play important roles in gallbladder cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(7), 4071-4075.
- Hautmann, R. (Ed.) (2010). *Urologie : mit 143 Tabellen* (4., überarb. und aktualisierte Aufl. ed.). Heidelberg: Springer.
- Hejna, M., Schmidinger, M., & Raderer, M. (2002). The clinical role of somatostatin analogues as antineoplastic agents: much ado about nothing? *Ann Oncol*, 13(5), 653-668. doi:10.1093/annonc/mdf142
- Hicks, R. M., Walters, C. L., Elsebai, I., Aasser, A. B., Merzabani, M. E., & Gough, T. A. (1977). Demonstration of nitrosamines in human urine:

- preliminary observations on a possible etiology for bladder cancer in association with chronic urinary tract infections. *Proc R Soc Med*, 70(6), 413-417.
- Hoyer, D., Epelbaum, J., Feniuk, W., Humphrey, P.P., et al. (2000). Somatostatin receptors. *Watson, S.P., Girdlestone, D. (Eds.), The IUPHAR Compendium of Receptor Characterisation and Classification, second ed.*
- Hsu, S. M., Raine, L., & Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29(4), 577-580.
- Iftikhar, S. Y., Thomas, W. M., Rooney, P. S., & Morris, D. L. (1992). Somatostatin receptors in human colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*, 18(1), 27-30.
- Institute, N. C. (2019). NCI Dictionary of Cancer Terms.
- J. Alfred Witjes, T. L., Eva M. Comperat, Nigel C. Cowan, Maria De Santis. (2016). Updated 2016 EAU Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer. *Eur Urol*, 65(4), 778-792. doi:10.1016/j.eururo.2013.11.046.
- Jiang, X., Yuan, J. M., Skipper, P. L., Tannenbaum, S. R., & Yu, M. C. (2007). Environmental tobacco smoke and bladder cancer risk in never smokers of Los Angeles County. *Cancer Res*, 67(15), 7540-7545. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0048
- K. Lindemann-Docter, R. K.-C. (2008). Histopathologie des Harnblasenkarzinoms. *Der Urologe*, 47, 627-638.
- Kaemmerer, D., Schindler, R., Mussbach, F., Dahmen, U., Altendorf-Hofmann, A., Dirsch, O., . . . Lupp, A. (2017). Somatostatin and CXCR4 chemokine receptor expression in hepatocellular and cholangiocellular carcinomas: tumor capillaries as promising targets. *BMC Cancer*, 17(1), 896. doi:10.1186/s12885-017-3911-3
- Kamoun, A., de Reynies, A., Allory, Y., Sjudahl, G., Robertson, A. G., Seiler, R., . . . Radvanyi, F. (2019). A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol*. doi:10.1016/j.eururo.2019.09.006
- Kantor, A. F., Hartge, P., Hoover, R. N., Narayana, A. S., Sullivan, J. W., & Fraumeni, J. F., Jr. (1984). Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am J Epidemiol*, 119(4), 510-515.
- Kaplan, E. L., Meier, P. (1958). Individual Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, 53(282), S. 457-481.
- Karavitakis, M., Msaouel, P., Michalopoulos, V., & Koutsilieris, M. (2014). Pattern of somatostatin receptors expression in normal and bladder cancer tissue samples. *Anticancer Res*, 34(6), 2937-2942.
- Kaufman, J. M., Fam, B., Jacobs, S. C., Gabilondo, F., Yalla, S., Kane, J. P., & Rossier, A. B. (1977). Bladder cancer and squamous metaplasia in spinal cord injury patients. *J Urol*, 118(6), 967-971.

- Kim, W. J., & Bae, S. C. (2008). Molecular biomarkers in urothelial bladder cancer. *Cancer Sci*, 99(4), 646-652. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00735.x
- Kirkali, Z., Chan, T., Manoharan, M., Algaba, F., Busch, C., Cheng, L., . . . Weider, J. (2005). Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*, 66(6 Suppl 1), 4-34. doi:10.1016/j.urology.2005.07.062
- Koch-Institut, R. (2010). Zentrum für Krebsregisterdaten ZfKD. Retrieved from http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html
- Koch, B. D., & Schonbrunn, A. (1988). Characterization of the cyclic AMP-independent actions of somatostatin in GH cells. II. An increase in potassium conductance initiates somatostatin-induced inhibition of prolactin secretion. *J Biol Chem*, 263(1), 226-234.
- Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, A., Barlund, M., Schraml, P., Leighton, S., . . . Kallioniemi, O. P. (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*, 4(7), 844-847.
- Kruskal, W. H., Wallis, W.A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47: 583-621.
- Kumar, B., De Silva, M., Venter, D. J., & Armes, J. E. (2004). Tissue microarrays: a practical guide. *Pathology*, 36(4), 295-300. doi:10.1080/00313020410001721555
- Kwekkeboom, D., Krenning, E. P., & de Jong, M. (2000). Peptide receptor imaging and therapy. *J Nucl Med*, 41(10), 1704-1713.
- Lamberts, S. W., van der Lely, A. J., de Herder, W. W., & Hofland, L. J. (1996). Octreotide. *N Engl J Med*, 334(4), 246-254. doi:10.1056/nejm199601253340408
- Lammers, R. J., Witjes, W. P., Hendricksen, K., Caris, C. T., Janzing-Pastors, M. H., & Witjes, J. A. (2011). Smoking status is a risk factor for recurrence after transurethral resection of non-muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol*, 60(4), 713-720. doi:10.1016/j.eururo.2011.07.010
- Li, P., Znaor, A., Holcatova, I., Fabianova, E., Mates, D., Wozniak, M. B., . . . Scelo, G. (2014). Regional Geographic Variations in Kidney Cancer Incidence Rates in European Countries. *Eur Urol*. doi:10.1016/j.eururo.2014.11.001
- Lin, C. Y., Varma, M. G., Joubel, A., Madabushi, S., Lichtarge, O., & Barber, D. L. (2003). Conserved motifs in somatostatin, D2-dopamine, and alpha 2B-adrenergic receptors for inhibiting the Na-H exchanger, NHE1. *J Biol Chem*, 278(17), 15128-15135. doi:10.1074/jbc.M212315200
- Lin, X., Voyno-Yasenetskaya, T. A., Hooley, R., Lin, C. Y., Orłowski, J., & Barber, D. L. (1996). Galpha12 differentially regulates Na+-H+ exchanger isoforms. *J Biol Chem*, 271(37), 22604-22610. doi:10.1074/jbc.271.37.22604
- Liu, D., Martino, G., Thangaraju, M., Sharma, M., Halwani, F., Shen, S. H., . . . Srikant, C. B. (2000). Caspase-8-mediated intracellular acidification precedes mitochondrial dysfunction in somatostatin-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 275(13), 9244-9250. doi:10.1074/jbc.275.13.9244

- Longuespee, R., Fleron, M., Pottier, C., Quesada-Calvo, F., Meuwis, M. A., Baiwir, D., . . . De Pauw, E. (2014). Tissue proteomics for the next decade? Towards a molecular dimension in histology. *Omics*, *18*(9), 539-552. doi:10.1089/omi.2014.0033
- Lotan, Y., Bagrodia, A., Passoni, N., Rachakonda, V., Kapur, P., Arriaga, Y., . . . Shariat, S. F. (2013). Prospective evaluation of a molecular marker panel for prediction of recurrence and cancer-specific survival after radical cystectomy. *Eur Urol*, *64*(3), 465-471. doi:10.1016/j.eururo.2013.03.043
- Madersbacher, S., Hochreiter, W., Burkhard, F., Thalmann, G. N., Danuser, H., Markwalder, R., & Studer, U. E. (2003). Radical cystectomy for bladder cancer today--a homogeneous series without neoadjuvant therapy. *J Clin Oncol*, *21*(4), 690-696.
- Mallofre, C., Castillo, M., Morente, V., & Sole, M. (2003). Immunohistochemical expression of CK20, p53, and Ki-67 as objective markers of urothelial dysplasia. *Mod Pathol*, *16*(3), 187-191. doi:10.1097/01.mp.0000056628.38714.5d
- Mantel, N. (1966). Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep*, *50*(3), 163-170.
- Matkowskyj, K. A., Cox, R., Jensen, R. T., & Benya, R. V. (2003). Quantitative immunohistochemistry by measuring cumulative signal strength accurately measures receptor number. *J Histochem Cytochem*, *51*(2), 205-214.
- Maygarden, S. J., Novotny, D. B., Moul, J. W., Bae, V. L., & Ware, J. L. (1994). Evaluation of cathepsin D and epidermal growth factor receptor in prostate carcinoma. *Mod Pathol*, *7*(9), 930-936.
- Merseburger, A. S., Anastasiadis, A. G., Hennenlotter, J., Schilling, D., Simon, P., Machtens, S. A., . . . Kuczyk, M. A. (2006). Tissue microarrays: applications in urological cancer research. *World J Urol*, *24*(5), 579-584. doi:10.1007/s00345-006-0103-1
- Metts, M. C., Metts, J. C., Milito, S. J., & Thomas, C. R., Jr. (2000). Bladder cancer: a review of diagnosis and management. *J Natl Med Assoc*, *92*(6), 285-294.
- Mizutani, G., Nakanishi, Y., Watanabe, N., Honma, T., Obana, Y., Seki, T., . . . Nemoto, N. (2012). Expression of Somatostatin Receptor (SSTR) Subtypes (SSTR-1, 2A, 3, 4 and 5) in Neuroendocrine Tumors Using Real-time RT-PCR Method and Immunohistochemistry. *Acta Histochem Cytochem*, *45*(3), 167-176. doi:10.1267/ahc.12006
- Mohammed, A. A., El-Tanni, H., El-Khatib, H. M., Mirza, A. A., Mirza, A. A., & Alturaifi, T. H. (2016). Urinary Bladder Cancer: Biomarkers and Target Therapy, New Era for More Attention. *Oncol Rev*, *10*(2), 320. doi:10.4081/oncol.2016.320
- Moller, L. N., Stidsen, C. E., Hartmann, B., & Holst, J. J. (2003). Somatostatin receptors. *Biochim Biophys Acta*, *1616*(1), 1-84.
- Moody, T. W., Ramos-Alvarez, I., & Jensen, R. T. (2018). Neuropeptide G Protein-Coupled Receptors as Oncotargets. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *9*, 345. doi:10.3389/fendo.2018.00345

- Murray, R. D., Kim, K., Ren, S. G., Chelly, M., Umehara, Y., & Melmed, S. (2004). Central and peripheral actions of somatostatin on the growth hormone-IGF-I axis. *J Clin Invest*, *114*(3), 349-356. doi:10.1172/jci19933
- Nguyen, P. L., Swanson, P. E., Jaszcz, W., Aeppli, D. M., Zhang, G., Singleton, T. P., . . . Niehans, G. A. (1994). Expression of epidermal growth factor receptor in invasive transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A multivariate survival analysis. *Am J Clin Pathol*, *101*(2), 166-176.
- Papotti, M., Croce, S., Macri, L., Funaro, A., Pecchioni, C., Schindler, M., & Bussolati, G. (2000). Correlative immunohistochemical and reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of somatostatin receptor type 2 in neuroendocrine tumors of the lung. *Diagn Mol Pathol*, *9*(1), 47-57.
- Patel, Y. C. (1999). Somatostatin and its receptor family. *Front Neuroendocrinol*, *20*(3), 157-198. doi:10.1006/frne.1999.0183
- Patel, Y. C., Greenwood, M., Kent, G., Panetta, R., & Srikant, C. B. (1993). Multiple gene transcripts of the somatostatin receptor SSTR2: tissue selective distribution and cAMP regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, *192*(1), 288-294. doi:10.1006/bbrc.1993.1412
- Pawlik, W. W., Gustaw, P., Czarnobilski, K., Sendur, R., & Konturek, S. J. (1989). Effects of somatostatin on intestinal circulation and oxygen consumption. *Acta Physiol Hung*, *74*(3-4), 277-283.
- Pedraza-Arevalo, S., Hormaechea-Agulla, D., Gomez-Gomez, E., Requena, M. J., Selth, L. A., Gahete, M. D., . . . Luque, R. M. (2017). Somatostatin receptor subtype 1 as a potential diagnostic marker and therapeutic target in prostate cancer. *Prostate*, *77*(15), 1499-1511. doi:10.1002/pros.23426
- Popov, Z., Hoznek, A., Colombel, M., Bastuji-Garin, S., Lefrere-Belda, M. A., Bellot, J., . . . Chopin, D. K. (1997). The prognostic value of p53 nuclear overexpression and MIB-1 as a proliferative marker in transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer*, *80*(8), 1472-1481.
- Powles, T., Eder, J. P., Fine, G. D., Braiteh, F. S., Loria, Y., Cruz, C., . . . Vogelzang, N. J. (2014). MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*, *515*(7528), 558-562. doi:10.1038/nature13904
- Pruthi, R. S., Nielsen, M., Heathcote, S., Wallen, E. M., Rathmell, W. K., Godley, P., . . . Kim, W. (2010). A phase II trial of neoadjuvant erlotinib in patients with muscle-invasive bladder cancer undergoing radical cystectomy: clinical and pathological results. *BJU Int*, *106*(3), 349-354. doi:10.1111/j.1464-410X.2009.09101.x
- Ren, S. G., Taylor, J., Dong, J., Yu, R., Culler, M. D., & Melmed, S. (2003). Functional association of somatostatin receptor subtypes 2 and 5 in inhibiting human growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab*, *88*(9), 4239-4245. doi:10.1210/jc.2003-030303
- Reubi, J. C. (2004). Somatostatin and other Peptide receptors as tools for tumor diagnosis and treatment. *Neuroendocrinology*, *80 Suppl 1*, 51-56. doi:10.1159/000080742
- Reubi, J. C., Kvolts, L. K., Waser, B., Nagorney, D. M., Heitz, P. U., Charboneau, J. W., . . . Moertel, C. (1990). Detection of somatostatin

- receptors in surgical and percutaneous needle biopsy samples of carcinoids and islet cell carcinomas. *Cancer Res*, 50(18), 5969-5977.
- Reubi, J. C., Laissue, J., Krenning, E., & Lamberts, S. W. (1992). Somatostatin receptors in human cancer: incidence, characteristics, functional correlates and clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 43(1-3), 27-35.
- Reubi, J. C., & Waser, B. (2003). Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumours: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30(5), 781-793. doi:10.1007/s00259-003-1184-3
- Reubi, J. C., Waser, B., Foekens, J. A., Klijn, J. G., Lamberts, S. W., & Laissue, J. (1990). Somatostatin receptor incidence and distribution in breast cancer using receptor autoradiography: relationship to EGF receptors. *Int J Cancer*, 46(3), 416-420. doi:10.1002/ijc.2910460315
- Reubi, J. C., Waser, B., Schaer, J. C., & Laissue, J. A. (2001). Somatostatin receptor sst1-sst5 expression in normal and neoplastic human tissues using receptor autoradiography with subtype-selective ligands. *Eur J Nucl Med*, 28(7), 836-846.
- Reubi, J. C., Waser, B., Schaer, J. C., & Markwalder, R. (1995). Somatostatin receptors in human prostate and prostate cancer. *J Clin Endocrinol Metab*, 80(9), 2806-2814. doi:10.1210/jcem.80.9.7673428
- Roberts, J. T., von der Maase, H., Sengelov, L., Conte, P. F., Dogliotti, L., Oliver, T., . . . Arning, M. (2006). Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine/cisplatin and methotrexate/vinblastine/doxorubicin/cisplatin in patients with locally advanced and metastatic bladder cancer. *Ann Oncol*, 17 Suppl 5, v118-122. doi:10.1093/annonc/mdj965
- Robertson, A. G., Kim, J., Al-Ahmadie, H., Bellmunt, J., Guo, G., Cherniack, A. D., . . . Lerner, S. P. (2018). Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*, 174(4), 1033. doi:10.1016/j.cell.2018.07.036
- Romeis. (2010). *Mikroskopische Technik*. 18. Auflage, 200.
- Rosenberg, J. E., Hoffman-Censits, J., Powles, T., van der Heijden, M. S., Balar, A. V., Necchi, A., . . . Dreicer, R. (2016). Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet*, 387(10031), 1909-1920. doi:10.1016/s0140-6736(16)00561-4
- Rübben, H. (2014). *Uroonkologie : [eBook inside] / Herbert Rübben (Hrsg.)* (Vol. 6). Berlin, Heidelberg: Rübben, H.
- Rushton, L., Bagga, S., Bevan, R., Brown, T. P., Cherrie, J. W., Holmes, P., . . . Hutchings, S. J. (2010). Occupation and cancer in Britain. *Br J Cancer*, 102(9), 1428-1437. doi:10.1038/sj.bjc.6605637
- Schmelz, H.-U. (2014). *Facharztwissen Urologie : Differenzierte Diagnostik und Therapie*. In C. Sparwasser (Ed.), *SpringerLink : Bücher*. Retrieved from <http://swbplus.bsz-bw.de/bsz415346606cov.htm>
<http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-44942-0> doi:10.1007/978-3-642-44942-0

- Sessler, D. I., & Imrey, P. B. (2015). Clinical Research Methodology 1: Study Designs and Methodologic Sources of Error. *Anesth Analg*, *121*(4), 1034-1042. doi:10.1213/ane.0000000000000815
- Sharma, K., Patel, Y. C., & Srikant, C. B. (1996). Subtype-selective induction of wild-type p53 and apoptosis, but not cell cycle arrest, by human somatostatin receptor 3. *Mol Endocrinol*, *10*(12), 1688-1696. doi:10.1210/mend.10.12.8961277
- Shimon, I., Taylor, J. E., Dong, J. Z., Bitonte, R. A., Kim, S., Morgan, B., . . . Melmed, S. (1997). Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures. Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation. *J Clin Invest*, *99*(4), 789-798. doi:10.1172/jci119225
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., & Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, *64*(1), 9-29. doi:10.3322/caac.21208
- Spruck, C. H., 3rd, Ohneseit, P. F., Gonzalez-Zulueta, M., Esrig, D., Miyao, N., Tsai, Y. C., . . . et al. (1994). Two molecular pathways to transitional cell carcinoma of the bladder. *Cancer Res*, *54*(3), 784-788.
- Srikant, C. B. (1995). Cell cycle dependent induction of apoptosis by somatostatin analog SMS 201-995 in AtT-20 mouse pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *209*(2), 400-406. doi:10.1006/bbrc.1995.1517
- Stein, J. P., Lieskovsky, G., Cote, R., Groshen, S., Feng, A. C., Boyd, S., . . . Skinner, D. G. (2001). Radical cystectomy in the treatment of invasive bladder cancer: long-term results in 1,054 patients. *J Clin Oncol*, *19*(3), 666-675. doi:10.1200/jco.2001.19.3.666
- Stein, J. P., & Skinner, D. G. (2004). Surgical atlas. Radical cystectomy. *BJU Int*, *94*(1), 197-221. doi:10.1111/j.1464-410X.2004.04981.x
- Stenzl, A., Cowan, N. C., De Santis, M., Kuczyk, M. A., Merseburger, A. S., Ribal, M. J., . . . Witjes, J. A. (2012). [Treatment of muscle-invasive and metastatic bladder cancer: update of the EAU guidelines]. *Actas Urol Esp*, *36*(8), 449-460. doi:10.1016/j.acuro.2011.11.001
- Stern, M. C., Lin, J., Figueroa, J. D., Kelsey, K. T., Kiltie, A. E., Yuan, J. M., . . . Garcia-Closas, M. (2009). Polymorphisms in DNA repair genes, smoking, and bladder cancer risk: findings from the international consortium of bladder cancer. *Cancer Res*, *69*(17), 6857-6864. doi:10.1158/0008-5472.can-09-1091
- Stumpf, C., Kaemmerer, D., Neubauer, E., Sanger, J., Schulz, S., & Lupp, A. (2018). Somatostatin and CXCR4 expression patterns in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung relative to small cell lung cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, *144*(10), 1921-1932. doi:10.1007/s00432-018-2722-5
- Sun, L. C., & Coy, D. H. (2011). Somatostatin receptor-targeted anti-cancer therapy. *Curr Drug Deliv*, *8*(1), 2-10.
- Sun, L. C., Luo, J., Mackey, L. V., Fuselier, J. A., & Coy, D. H. (2007). A conjugate of camptothecin and a somatostatin analog against prostate cancer cell invasion via a possible signaling pathway involving PI3K/Akt, alphaVbeta3/alphaVbeta5 and MMP-2/-9. *Cancer Lett*, *246*(1-2), 157-166. doi:10.1016/j.canlet.2006.02.016

- Szereday, Z., Schally, A. V., Szepeshazi, K., Bajo, A. M., Hebert, F., Halmos, G., & Nagy, A. (2003). Effective treatment of H838 human non-small cell lung carcinoma with a targeted cytotoxic somatostatin analog, AN-238. *Int J Oncol*, *22*(5), 1141-1146.
- Tallent, M., Liapakis, G., O'Carroll, A. M., Lolait, S. J., Dichter, M., & Reisine, T. (1996). Somatostatin receptor subtypes SSTR2 and SSTR5 couple negatively to an L-type Ca²⁺ current in the pituitary cell line AtT-20. *Neuroscience*, *71*(4), 1073-1081.
- Taniyama, Y., Suzuki, T., Mikami, Y., Moriya, T., Satomi, S., & Sasano, H. (2005). Systemic distribution of somatostatin receptor subtypes in human: an immunohistochemical study. *Endocr J*, *52*(5), 605-611.
- Taylor, C. R., & Levenson, R. M. (2006). Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*, *49*(4), 411-424. doi:10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x
- Teijeiro, R., Rios, R., Costoya, J. A., Castro, R., Bello, J. L., Devesa, J., & Arce, V. M. (2002). Activation of human somatostatin receptor 2 promotes apoptosis through a mechanism that is independent from induction of p53. *Cell Physiol Biochem*, *12*(1), 31-38. doi:47824
- Thangaraju, M., Sharma, K., Leber, B., Andrews, D. W., Shen, S. H., & Srikant, C. B. (1999). Regulation of acidification and apoptosis by SHP-1 and Bcl-2. *J Biol Chem*, *274*(41), 29549-29557. doi:10.1074/jbc.274.41.29549
- Theodoropoulou, M., & Stalla, G. K. (2013). Somatostatin receptors: from signaling to clinical practice. *Front Neuroendocrinol*, *34*(3), 228-252. doi:10.1016/j.yfrne.2013.07.005
- Theodoropoulou, M., Zhang, J., Laupheimer, S., Paez-Pereda, M., Erneux, C., Florio, T., . . . Stalla, G. K. (2006). Octreotide, a somatostatin analogue, mediates its antiproliferative action in pituitary tumor cells by altering phosphatidylinositol 3-kinase signaling and inducing Zac1 expression. *Cancer Res*, *66*(3), 1576-1582. doi:10.1158/0008-5472.Can-05-1189
- Todenhofer, T., Hennenlotter, J., Esser, M., Mohrhardt, S., Tews, V., Aufderklamm, S., . . . Schwentner, C. (2013). Combined application of cytology and molecular urine markers to improve the detection of urothelial carcinoma. *Cancer Cytopathol*, *121*(5), 252-260. doi:10.1002/cncy.21247
- van Eijck, C. H., Krenning, E. P., Bootsma, A., Oei, H. Y., van Pel, R., Lindemans, J., . . . Lamberts, S. W. (1994). Somatostatin-receptor scintigraphy in primary breast cancer. *Lancet*, *343*(8898), 640-643.
- van Hagen, P. M., Krenning, E. P., Kwekkeboom, D. J., Reubi, J. C., Anker-Lugtenburg, P. J., Lowenberg, B., & Lamberts, S. W. (1994). Somatostatin and the immune and haematopoietic system; a review. *Eur J Clin Invest*, *24*(2), 91-99.
- Vineis, P., & Pirastu, R. (1997). Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes Control*, *8*(3), 346-355.
- von der Maase, H., Hansen, S. W., Roberts, J. T., Dogliotti, L., Oliver, T., Moore, M. J., . . . Conte, P. F. (2000). Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or

- metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J Clin Oncol*, 18(17), 3068-3077.
- Waldhoer, T., Berger, I., Haidinger, G., Zielonke, N., & Madersbacher, S. (2015). Sex Differences of \geq pT1 Bladder Cancer Survival in Austria: A Descriptive, Long-Term, Nation-Wide Analysis Based on 27,773 Patients. *Urol Int*. doi:10.1159/000368418
- Wang, L., Mudaliar, K., Mehta, V., Barkan, G. A., Quek, M. L., Flanigan, R. C., & Picken, M. M. (2014). Seeking a standard for adequate pathologic lymph node staging in primary bladder carcinoma. *Virchows Arch*, 464(5), 595-602. doi:10.1007/s00428-014-1575-9
- Weckbecker, G., Lewis, I., Albert, R., Schmid, H. A., Hoyer, D., & Bruns, C. (2003). Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov*, 2(12), 999-1017. doi:10.1038/nrd1255
- Weiss, B. E., Pietzak, E. J., Wein, A. J., Malkowicz, S. B., & Guzzo, T. J. (2015). Single instillation of mitomycin C plus bacillus Calmette-Guerin (BCG) versus BCG alone in high grade non-muscle invasive bladder cancer. *Can J Urol*, 22(4), 7876-7881.
- Witjes, J. A., Comperat, E., Cowan, N. C., De Santis, M., Gakis, G., Le Bret, T., . . . European Association of, U. (2014). EAU guidelines on muscle-invasive and metastatic bladder cancer: summary of the 2013 guidelines. *Eur Urol*, 65(4), 778-792. doi:10.1016/j.eururo.2013.11.046
- Woltering, E. A. (2003). Development of targeted somatostatin-based antiangiogenic therapy: a review and future perspectives. *Cancer Biother Radiopharm*, 18(4), 601-609. doi:10.1089/108497803322287691
- Wynder, E. L., & Goldsmith, R. (1977). The epidemiology of bladder cancer: a second look. *Cancer*, 40(3), 1246-1268.
- Zaak, D., Hungerhuber, E., Schneede, P., Stepp, H., Frimberger, D., Corvin, S., . . . Knuechel, R. (2002). Role of 5-aminolevulinic acid in the detection of urothelial premalignant lesions. *Cancer*, 95(6), 1234-1238. doi:10.1002/cncr.10821

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Hiermit erkläre ich, Lisa Mayer, geb. Rudolph, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet.

Die Idee zur Konzeption dieser Studie entstand im Bereich der Uro-Onkologie der Urologischen Klinik der Universität Tübingen in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Dr. h.c. Arnulf Stenzl, dem Ärztlichen Direktor der Urologischen Klinik der Universität Tübingen, Herrn Prof. Dr. med. Tilman Todenhöfer, meinem betreuenden Doktorvater aus der Universitätsklinik für Urologie Tübingen und Dipl.-Biol. Jörg Hennenlotter, dem wissenschaftlichen Betreuer dieser Arbeit.

Bei dieser Arbeit wurde auf einen bestehenden TMA-Block und eine bestehende Datenbank zurückgegriffen. Die Erstellung des Kollektivs und der Basisdatenbank, sowie Anfertigung des TMAs wurden teilweise von Frau Katharina Teepe vorgenommen. Ihr gilt mein Dank, auch für die Bereitschaft mich bei sämtlichen anderen Fragen mit Rat und Tat zu unterstützen. Bei den immunhistochemischen Färbungen war Frau U. Kührs, medizinisch-technische Assistentin des urologischen Labors, beteiligt.

Alle weiteren Daten wurden von mir persönlich erhoben. Die statistische Auswertung und Interpretation aller Daten geschah nach Anleitung durch Prof. Dr. med. Todenhöfer durch mich.

Lisa Mayer

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht bzw. als Posterpräsentation vorgestellt.

Maas, M., Rudolph, L., Hennenlotter, J., Walz, S., Scharpf, M., Kuehs, U., Neumann, T., Stenzl, A., Todenhoefer, T. (2018). „Expression of Somatostatin Receptors in patients with advanced bladder cancer is an indicator for favorable outcome.“ *The Journal of Urology*, Volume 199, Issue 4, e528

Deutsche Gesellschaft für Urologie e.V. (DGU), Dresden, 2018 und American Urological Association (AUA), San Francisco, 2018:

Maas, M., Rudolph, L., Walz, S., Hennenlotter, J., Scharpf, M., Kuehs, U., Neumann, T., Stenzl, A., Todenhoefer, T. (2018). „Somatostatin receptor expression is associated with favourable outcome in patients with advanced bladder cancer“.

Zur Publikation angenommen:

Moritz Maas, Lisa Mayer, Jörg Hennenlotter, Viktoria Stühler, Simon Walz, Marcus Scharpf, Ursula Kühs, Tim Neumann, Arnulf Stenzl, Tilman Todenhöfer (2020). „Prognostic impact of somatostatin receptor expression in advanced bladder cancer.“ *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*