

Aus der Klinik für Innere Medizin I
mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Pneumologie, internistische
Intensivmedizin, Endokrinologie, Infektiologie, Rheumatologie, Ernährungs- und Altersmedizin
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Schreiber)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Insulinrezeptorexpression im Kontext der Karzinogenese von sporadischen und Colitis ulcerosa-assoziierten kolorektalen Karzinomen

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Clara Sophie Bosselmann

aus Hamburg

Kiel, 2021

1. Berichterstatter*in: Prof. Dr. Stefan Schreiber, Klinik für Innere Medizin I mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Hepatologie, Ernährungs- und Altersmedizin
2. Berichterstatter*in: Priv. Doz. Dr. Ulf Helwig, Internistische Praxengem. Oldenburg

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2023

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 23.01.2023

gez.: Prof. Dr. Kai Wehkamp (Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
<u>1.1.</u> Das kolorektale Karzinom	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Pathogenese	1
1.1.3. Karzinogenese: Die Adenom-Karzinom-Sequenz	2
1.1.4. Diagnostik und Früherkennung	4
1.1.5. Therapie kolorektaler Adenome und Karzinome	5
<u>1.2.</u> Colitis ulcerosa und das Colitis ulcerosa-assoziierte Kolonkarzinom	6
1.2.1. Colitis ulcerosa	6
1.2.2. Karzinomrisiko bei Colitis ulcerosa	8
1.2.3. Pathogenese des Colitis ulcerosa-assoziierten Kolonkarzinoms	8
1.2.4. Karzinogenese: Die Dysplasie-Karzinom-Sequenz	9
1.2.5. Diagnostik und Früherkennung	9
1.2.6. Therapie der Colitis ulcerosa-assoziierten Dysplasie und des Colitis ulcerosa-assoziierten Karzinoms	11
<u>1.3.</u> Insulinrezeptor und Insulin/Insulin-like growth factor-System	12
1.3.1. Insulin	12
1.3.2. Der Insulinrezeptor: Aufbau und zelluläre Wirkweise	13
1.3.3. Die Isoformen des Insulinrezeptors	17
1.3.4. Das Insulin/Insulin-like growth factor-System	19
1.3.5. Diabetes mellitus Typ 2 und das metabolische Syndrom	23
<u>1.4.</u> Der Insulinrezeptor als Treiber der Karzinogenese	25
<u>1.5.</u> Fragestellung	27
2. Material und Methoden	28
<u>2.1.</u> Studiendesign	28
<u>2.2.</u> Gewebeschnitte	29
<u>2.3.</u> Immunhistochemische Färbung	29
2.3.1. Materialien	29
2.3.2. Durchführung	31
<u>2.4.</u> Antikörperetablierung und Antikörper	34
<u>2.5.</u> Histologische Auswertung	36
<u>2.6.</u> Statistische Auswertung	38
3. Ergebnisse	39
<u>3.1.</u> Zusammensetzung des Patientenkollektivs	39
<u>3.2.</u> Allgemeine Beobachtungen	40
3.2.1. Heterogenität	40
3.2.2. Zytoplasmatische und membranständige Insulinrezeptorexpression	42
3.2.3. Kryptengradient	45

<u>3.3.</u> Colitis ulcerosa-assoziierte Dysplasie und nicht-dysplastisches Umgebungsgewebe	46
<u>3.4.</u> Nicht-dysplastische Mukosa von Patienten mit Colitis ulcerosa	48
<u>3.5.</u> Colitis ulcerosa-assoziiertes Kolonkarzinom	49
<u>3.6.</u> Low-grade Adenome und nicht-adenomatöses Umgebungsgewebe	51
<u>3.7.</u> Kontrollgruppe.....	52
<u>3.8.</u> Zusammenfassung der Ergebnisse.....	53
4. Diskussion	55
<u>4.1.</u> Klinische Relevanz der Studie	55
<u>4.2.</u> Interpretation der immunhistochemischen Ergebnisse.....	56
4.2.1. Zytoplasmatische und membranständige Insulinrezeptorexpression	57
4.2.2. Verteilung der Insulinrezeptorexpression im Gewebe.....	58
<u>4.3.</u> Rückschlüsse auf die Karzinogenese	60
4.3.1. Colitis ulcerosa und Karzinogenese des Colitis ulcerosa-assoziierten Karzinoms.....	60
4.3.2. Karzinogenese des sporadischen kolorektalen Karzinoms	62
4.3.3. Vaskuläre Insulinrezeptorexpression und lokale Entzündung	64
<u>4.4.</u> Fazit.....	66
5. Zusammenfassung	68
<u>II.</u> Literaturverzeichnis	70
<u>III.</u> Abbildungsverzeichnis	76
<u>IV.</u> Tabellenverzeichnis	77
<u>V.</u> Anhang.....	78
1. Publikation	78
2. Ethikvotum	79
3. Eidesstattliche Versicherung.....	80
4. Danksagung	81

I. Abkürzungsverzeichnis

(B)RAF	(Isoform B des) „rapidly accelerated fibrosarcoma“-Protein
(c-)Src	Tyrosinkinase „cellular-sarcoma“
14-3-3	Familie von regulatorischen Proteinen in eukaryoten Zellen
5-ASA	5-Aminosalizylate
ABD	„Antibody Diluent“
Akt	Proteinkinase B
ALM	„Adenom-assoziierte Läsion oder Masse“
Ang	Angiogenin
APC	Adenomatöses Polyposis Coli Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	„Bcl-2-Antagonist of Cell Death“
BAX	„Bcl-2-associated X Protein“
BMI	Body-Mass-Index
Cbl	Ubiquitinligase „Casitas B-lineage Lymphoma“
cCRC	Colitis ulcerosa-assoziiertes Kolonkarzinom
CEA	Carcinoembryonales Antigen, Tumormarker
COX-1 und -2	Cyclooxygenase-1 und -2
CpG	Cystein-Guanin-reiche Abschnitte der DNA
CR	Cysteinreiche Domäne des Insulinrezeptors
Crk II	Proto-Onkogen „CT10 Regulator of Kinase“, = p38
CT	Carboxyl-Ende des Insulinrezeptors
CU	Colitis ulcerosa
DALM	Dysplasia associated lesion or mass / Dyplasie-assoziierte Läsion oder Masse
DCC	Tumorsuppressorgen „Deleted in colorectal cancer“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPC4	= SMAD2, s.u.
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK-1 und -2	„Extracellular-signal regulated kinases“, Isoformen 1 und 2
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FFPE	„Formalin-Fixed Paraffin-Embedded“
FnIII-1-4	„Fibronectin Typ 3 Domänen 1-4“ des Insulinrezeptors
FOBT	fäkal-occultes Bluttest
FOXO	Forkhead-Box-Protein-O-Gruppe
GLUT 1-4	Glukosetransporter 1-4
Grb2	„Growth factor receptor-bound protein 2“
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
HbA1c	glycosyliertes Hämoglobin A1c
HDL	High-Density-Lipoprotein
HIF1α	Hypoxie-induzierter Faktor α
hMLH1	DNA-Mismatch-Reparatur-Gen „human mutL homolog 1“
hMSH2	DNA-Mismatch-Reparatur-Gen „human MutS protein homolog 2“
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom (Lynch-Syndrom)
HScore	Histocore
IEN	Intraepitheliale Neoplasie
IGF-1,-2	„Insulin-like growth factor“, Somatomedine
IGF-1R und-2R	„Insulin-like growth factor“-1 und -2-Rezeptor
IGFBP	„Insulin-like growth factor“-Bindungs-Proteine
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IR	Insulinrezeptor
IR-A	Insulinrezeptor Isoform A
IR-B	Insulinrezeptor Isoform B
IRR	„Insulin related receptor“
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JM	Juxtamembranäre Domäne des Insulinrezeptors
KRAS	Protoonkogen „Kirsten RA Sarcoma“
L1, L2	„Large Domain 1,2“, Große Domänen des Insulinrezeptors
LDL	Low-Density-Lipoprotein
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
mdm2	Murine-Double-Minute-Onkogen 2
MEK-1, -2	„Mitogen-activated protein kinase kinase“-1 und -2
miRNA	mikro-Ribonukleinsäure

mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
mTOR	„Mechanistic Target of Rapamycin“
MUTYH	„mutY DNA glycosylase“-Gen
NFκB	Transkriptionsfaktor „nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“
p53	Transkriptionsfaktor, Tumorsuppressor „scheinbare Molekularmasse von 53 kDa“
PDE3B	Phosphodiesterase 3B
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PRAS40	„proline-rich AKT substrate of 40 kDa“
RAF	Proteinkinasen „rapidly accelerated fibrosarcoma“
RAS	G-Protein „rat sarcoma“
sCRC	sporadisches kolorektales Karzinom
Shc	„Src-Homology 2-containing protein 1“
SMAD4	Tumorsuppressorgen der Gruppe „Mothers against decapentaplegic“, Co-SMAD = „Common partner SMAD“, =DPC4
SOS	„Son of Sevenless“
STAT3	„Signal transducer and activator of transcription 3“
TBC1D1	GTPase aktivierendes Protein für Rab-Proteine
TBC1D4	Akt Substrat 160kDa
TBS	„Tris-buffered saline“, Tris-Base Substrat
TK	Tyrosinkinase
TMA	„Tissue Microarray“
TME	Tumormikroenvironment
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNM	T = Tumor, N = Nodus, M = Fernmetastasierung
TP53	Tumorsupressor-Gen für Protein „scheinbare Molekularmasse von 53 kDa“
TSC1	Hamartin = „Tuberous Sclerosis Complex 1“
TSC2	Tuberin = „Tuberous Sclerosis Complex 2“
UCEIS	„Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity“
UICC	„Union internationale contre le cancer“
UKSH	Universtitätsklinikum Schleswig-Holstein
VEGF	„Vascular endothelial growth factor“
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WNT	„Wingless Int-1“

Einleitung

1.1. Das kolorektale Karzinom

1.1.1. Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten Karzinomen in Deutschland, obwohl die absoluten Zahlen der jährlichen Neuerkrankungen (Inzidenz) abnehmen.¹ In der männlichen Bevölkerung hat das kolorektale Karzinom die dritthäufigste Inzidenz, in der weiblichen Bevölkerung ist es am zweithäufigsten.¹ Es ist die zweithäufigste karzinombedingte Todesursache bei Männern und die dritthäufigste bei Frauen.¹

1.1.2. Pathogenese

Anhand der unterschiedlichen Genese erfolgt die Unterteilung der Kolonkarzinome in sporadische kolorektale Karzinome (sCRC), hereditäre kolorektale Karzinome und kolorektale Karzinome im Rahmen von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.² Von großer Bedeutung sind dabei insbesondere die Colitis ulcerosa-assoziierten Kolonkarzinome (cCRC).²

Bei ca. 70% der Fälle entsteht das kolorektale Karzinom sporadisch aus Adenomen aufgrund von Punktmutationen ohne bekannte Ursache.³ Das Risiko an einem sCRC zu erkranken, steigt mit zunehmendem Alter.⁴ Proinflammatorische Prozesse und Dysbiose scheinen beteiligt zu sein, wobei Lebensstil und Ernährung als Einflussfaktoren eine entscheidende Rolle spielen.^{2,3} Regelmäßige körperliche Aktivität, eine ballaststoffreiche Ernährung und die Reduktion von Übergewicht gelten als Faktoren zur Senkung des sCRC-Risikos.² Besonders Übergewichtigkeit, definiert als ein Body-Mass-Index (BMI) über 25, ist mit einem erhöhten Risiko für kolorektale Adenome und Karzinome assoziiert.^{2,5} Dieser Zusammenhang ist vorwiegend bei Männern zu beobachten.^{5,6} Weitere Risikofaktoren sind außerdem der Verzehr von rotem Fleisch, Tabakrauch und Alkoholkonsum.^{6,7} Der wöchentliche Konsum von mehr als 100g Alkohol scheint das sCRC-Risiko um bis zu 15% zu erhöhen.^{2,7}

Bei 20-30% der Fälle treten kolorektale Karzinome familiär gehäuft auf, es ist jedoch nur ein Anteil von circa 5% auf hereditäre Syndrome zurückzuführen.^{2,8} Das Lynch-Syndrom, auch hereditäres nichtpolypöses kolorektales Karzinom (HNPCC)-Syndrom genannt, entsteht infolge von Mikrosatelliteninstabilität und Mutationen von Mismatch-Reparatur-Genen, wie

„human mutL homolog 1“ (hMLH1) und „human MutS protein homolog 2“ (hMSH2).⁸ Das CRC-Risiko bei Betroffenen liegt bei bis zu 70%, aber auch extraintestinale Malignome sind nicht selten.⁹ Bei der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP) kommt es aufgrund von Mutationen des Adenomatöses Polyposis Coli Protein (APC)-Gens zu einer extremen Ansammlung von Adenomen im Kolon.^{10,11} Hier besteht ein lebenslanges CRC-Risiko von fast 100%.² Die „mutY DNA glycosylase“ (MUTYH)-assoziierte Polyposis, das Peutz-Jeghers Syndrom, das Juvenile Polyposis Syndrom und die Hyperplastische Polyposose sind weitere Syndrome mit erhöhtem CRC-Risiko aufgrund von hereditären Mutationen.¹¹

1.1.3. Karzinogenese: Die Adenom-Karzinom-Sequenz

Das „Genetische Modell der kolorektalen Tumorgenese“ beschreibt eine Abfolge molekulargenetischer Ereignisse, die über mehrere Stadien bis zu der Entstehung des sCRC führen.¹² Fearon und Vogelstein definierten darin einen jahrelangen Prozess, welcher die Ausbildung eines hyperproliferativen Epithels, die Entwicklung des frühen, des intermediaten und des späten Adenoms und zuletzt die Entstehung des Karzinoms umfasst.^{4,12} Das Adenom als dysplastische Vorläuferläsion des Karzinoms weist bereits molekulargenetische Aberrationen auf, ohne jedoch den gesamten Kriterien eines Karzinoms zu entsprechen.¹³ Die Adenom-Karzinom-Sequenz wird bis heute als Modell für die Entwicklung der sCRC angesehen.¹⁴ Es ist allerdings vielmehr die Addition der molekulargenetischen Schäden als deren exakte Abfolge, die letztendlich die Karzinogenese vorantreibt.^{12,14} Ausschlaggebend sind dabei die Aktivierung von Onkogenen, die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Chromosomeninstabilität.^{3,4,15}

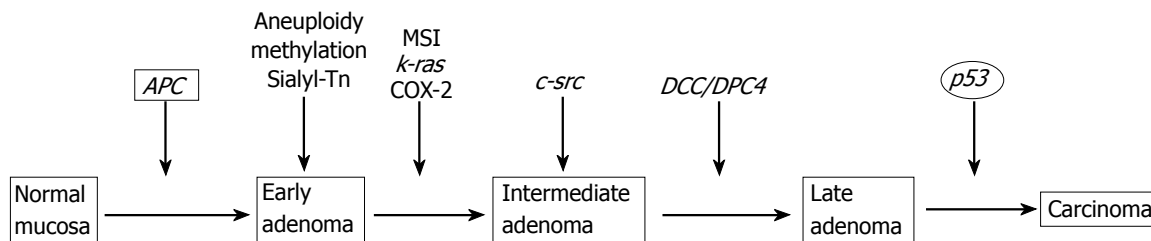


Abbildung 1.1. Die Adenom-Karzinom-Sequenz

(modifiziert aus „Cancer in inflammatory bowel disease“ von Xie und Itzkowitz 2008) ¹⁶

Im Verlauf der Karzinogenese kommt es zu multiplen sukzessiven genetischen Veränderungen.

Adenomatöses Polyposis Coli Protein (APC), Mikrosatelliteninstabilität (MSI), Protoonkogen „Kirsten Rat Sarcoma“ (k-Ras/KRAS), Cyclooxygenase-1 (COX-1), Tyrosinkinase „cellular-sarcoma“ (c-src), Tumorsuppressorgen „Deleted in colorectal cancer“ (DCC), Tumorsuppressorgen der Gruppe „Mothers against decapentaplegic“ (SMAD = DPC4), Transkriptionsfaktor mit molekularer Masse von 53 kDa (p53)

Ein frühes Ereignis der Karzinogenese ist der Verlust des APC-Gens auf Chromosom 5, wodurch es zu der Ausbildung eines hyperplastischen Epithels kommt.^{3,12} Entscheidend dabei ist die Hochregulation des proliferativen und anti-apoptotischen Wingless Int-1 (WNT)-Signalwegs aufgrund der ausgefallenen Regulation durch das APC-Protein.¹⁴ Folgend führt die Mutation des Proto-Onkogens *KRAS* zu der Förderung des intrazellulären Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-Signalwegs mit entsprechenden mitogenen Effekten.¹⁴ Die Genverluste von DCC und DPC4 (=SMAD4) auf Chromosom 18q und die Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 sind späte Ereignisse der Karzinogenese.^{12,16} Die Inaktivierung von p53 führt zu einer Dysregulation des Zellzyklus und ermöglicht die unkontrollierte Zellteilung und Invasivität des Karzinoms.^{3,14}

Alternativ entsteht ein geringerer Anteil des sCRC über serratierte Läsionen als Vorstufe und nicht gemäß der Adenom-Karzinom-Sequenz.¹⁷ Führende Ereignisse sind die Mutation der Isoform B des „rapidly accelerated fibrosarcoma“-Proteins (BRAF), woraus eine übermäßige Aktivierung der „Mitogen aktivierten Proteinkinase“ (MAPK) Kaskade resultiert.^{17,18} Dieser Signalweg wirkt proliferativ und anti-apoptotisch, ermöglicht ein verlängertes Zellüberleben und Invasivität.¹⁷ Darüber hinaus führt die Hypermethylierung von Cystein- und Guaninreichen Desoxyribonukleinsäure-(DNA)-Abschnitten, sogenannten CpG-Inseln, der Promotorregionen zu der Inaktivierung regulatorischer Gene, die für die Kontrolle von Teilung und Wachstum verantwortlich sind.^{17,18} Typisch ist eine Mikrosatelliteninstabilität.¹⁷

1.1.4. Diagnostik und Früherkennung

Das Auftreten von sporadischen kolorektalen Adenomen und Karzinomen ist typisch für das höhere Lebensalter, besonders ab dem 50. Lebensjahr ist die Inzidenz deutlich erhöht.^{19,20} Die Entartungswahrscheinlichkeit eines Adenoms steigt zudem mit zunehmenden Alter.²⁰ Das 10-Jahresrisiko für den Übergang eines fortgeschrittenen Adenoms in ein sCRC reicht von ca. 25% bei den 55- bis 59-Jährigen bis zu über 40% in der Altersgruppe über 80 Jahre.²⁰ Die aktuelle Leitlinie empfiehlt daher die Darmkrebsfrüherkennung ab dem 50. Lebensjahr für die Normalbevölkerung ohne Risikokonstellationen, wie familiäre Häufung oder bereits vorhandene Adenome.² Dabei gilt die Koloskopie als Goldstandard, da mit dieser Methode nicht nur Karzinome sondern auch Adenome mit hoher Sensitivität und Spezifität entdeckt werden können.²

Einschränkungen der endoskopischen Diagnostik stellen mangelnde Einsicht der gesamten Mukosa durch inkomplette Koloskopien, Stenosen und Stuhlreste im Darm dar sowie das Übersehen von flachen, kleinen Läsionen durch den Untersucher.²¹ Mögliche ergänzende Screeningmethoden umfassen die alleinige Sigmoidoskopie, den fäkal-okkulten Bluttest (FOBT) und gegebenenfalls die Computertomographie-Kolonographie.²

Die endoskopische Diagnostik ermöglicht als einzige Methode ein simultanes therapeutisches Vorgehen, sodass durch die Entfernung der Adenome die Karzinomentstehung verhindert werden kann.² Es erfolgt anschließend immer die Beurteilung durch den Pathologen.² Die histologische Einteilung der konventionellen Adenome erfolgt anhand des Wachstumsverhaltes in tubuläre, tubulovillöse und villöse Adenome sowie anhand des Differenzierungsgrades in low-grade und high-grade intraepitheliale Neoplasien (IEN).² Serratierte Läsionen werden unterteilt in hyperplastische Polypen, sessile serratierte Läsionen, gemischte Polypen und traditionelle serratierte Adenome.²

Die Ausbreitungsdiagnostik bei Nachweis eines kolorektalen Karzinoms umfasst das lokale Staging mittels kompletter Koloskopie sowie die Bestimmung des Tumormarkers „Carcinoembryonales Antigen“ (CEA) im Blut des Patienten.² Bei einem Rektumkarzinom werden zusätzlich eine starre Rektoskopie, eine Magnetresonanztomographie des Beckens und eine rektale Endosonographie zur Einschätzung der lokalen Ausbreitung durchgeführt.² Bei 25% der Patienten besteht bei Erstdiagnose bereits ein metastasierter Zustand.² Typische Lokalisationen sind Leber, Lunge und Peritoneum.² Das prätherapeutische Staging umfasst deshalb immer eine Abdomensonographie und eine Röntgenuntersuchung des Thorax in zwei Ebenen oder eine Computertomographie des Abdomen bzw. Thorax.²

1.1.5. Therapie kolorektaler Adenome und Karzinome

Gemäß der aktuellen „S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom“ (2019) sollten kolorektale Adenome komplett endoskopisch abgetragen werden.² Je nach Größe und Ausmaß wird dies durch eine Schlingen- oder Zangenpolypektomie, eine endoskopische Mukosaresektion oder eine endoskopische Submukosadisektion erreicht.² Eine laparoskopische oder offene Resektion ist nur in Einzelfällen indiziert.²

Die Größe, die Anzahl, die Histologie sowie die anamnestischen und familiären Risikofaktoren bestimmen das Intervall der folgenden endoskopischen Kontrollen.² Eine Nachsorge in normalen Abstand von 5-10 Jahren wird bei ein bis zwei Adenomen ohne high-grade IEN mit einer Größe unter 1cm empfohlen.²

Bei der Diagnose eines kolorektalen Karzinoms erfolgt die Einteilung anhand der Klassifikation der „Union internationale contre le cancer“ (UICC), welche die Grundlage der Therapieplanung und der Prognosebestimmung darstellt.² Die chirurgische Therapie des sCRC reicht, je nach TNM-Stadium und Risikoeinordnung, von lokaler Ablation bis hin zu einer onkologischen Resektion mit Lymphadenektomie oder kompletter mesokolischer Exzision.² Im UICC-Stadium I ist die alleinige Operation mit R0-Resektion bereits kurativ.⁴ Bei fortgeschrittenen Karzinomen wird die Durchführung einer adjuvanten Chemotherapie von dem genauen UICC-Stadium sowie den begleitenden Risikofaktoren abhängig gemacht.^{2,4} Die Resektion von Leber- und Lungenmetastasen ist im Rahmen kurativer Konzepte möglich.² In palliativer Situation wird eine alleinige palliative Chemotherapie empfohlen.²

UICC-Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1/T2	N0	M0
II	T3/T4	N0	M0
III	jedes T	N1/N2	M0
IV	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 1.1. Die UICC-Klassifikation des kolorektalen Karzinoms

(zusammengefasst aus der „S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom 2019“)²

Einteilung der UICC-Stadien nach TNM-Klassifikation. Dabei sind die relevanten Parameter die Ausdehnung des Tumors (T), der Nodalstatus (N) und die Fernmetastasierung (M).

Definitionsgemäß liegt ein Rektumkarzinom vor, wenn der Tumor in dem Bereich bis 16cm aboral der Anokutanlinie liegt.² Bei initial ausreichendem Abstand oder nach neoadjuvanter Therapie ausreichendem Abstand sollte ein operatives Verfahren mit Sphinktererhalt durchgeführt werden.² Im Gegensatz zu Kolonkarzinomen ist ein stadienabhängiger Bestandteil der Therapie rektaler Karzinome außerdem eine neoadjuvante Radiotherapie zusätzlich zu einer Chemotherapie.²

1.2. Colitis ulcerosa und das Colitis ulcerosa-assoziierte Kolonkarzinom

1.2.1. Colitis ulcerosa

Die Colitis ulcerosa (CU) ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung unklarer Genese, die differentialdiagnostisch vom Morbus Crohn abzugrenzen ist.^{22,23} In Deutschland liegt die Inzidenz der Erkrankung bei 3-4 Fällen pro 100000 Einwohnern.²⁴ Das typische Alter der Erstmanifestation liegt zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr, ein zweiter Altersgipfel existiert zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr.²³ Das Krankheitsrisiko ist geschlechtsunabhängig.^{22,23} Genetische Veränderungen können zu der Entwicklung einer CU prädisponieren.²² Familiäre Häufungen werden besonders bei weiblichen Betroffenen beobachtet.²⁵ Die Bedeutung von Umweltfaktoren ist weiterhin größtenteils unbekannt, unter anderem scheinen eine fettreiche Ernährung, eine Dysbiose und eine immunologische Dysregulation Einflussfaktoren darzustellen.^{23,26} Ein Zusammenhang besteht außerdem mit der ethnischen Herkunft und geographischen Lokalisation gemäß eines Nord-Süd-Gefälles innerhalb Europas.^{22,23}

Die CU verläuft schubweise mit Phasen der aktiven Entzündung sowie Remissionsphasen ohne Entzündungsaktivität.²⁵ Das klinische Bild im Entzündungsschub ist geprägt von blutiger Diarrhoe und abdominellen Schmerzen.²³ Im schwerem Schub können Fieber, Tachykardie und Anämie auftreten.²⁵ Die Remission zeichnet sich durch das Ausbleiben von Diarrhoe, Blutbeimengungen im Stuhl und weiteren Symptomen aus oder durch die endoskopisch gesicherte entzündungsfreie Kolonmukosa.^{22,25}

Die Koloskopie mit Histologiegewinnung ist das diagnostische Mittel der Wahl.²⁵ Charakteristisch für die CU ist eine kontinuierlich nach oral fortschreitende Ausbreitung beginnend im Rektum.²³ Dabei betrifft die Erkrankung nur das Rektum und Kolon, von dem restlichen Gastrointestinaltrakt kann einzig das terminale Ileum in Form einer „Backwash-Ileitis“ beteiligt sein.²² Histologische Merkmale sind Architekturstörungen der Krypten,

Entzündungsinfiltrate und der Verlust von Becherzellen sowie die Beschränkung der Ausbreitung auf die Mukosa ²⁵

Durch die aktuelle Leitlinie empfohlen wird die Einteilung anhand der endoskopischen Ausbreitung in Proktitis, Linksseitencolitis und ausgedehnte Colitis bis zur Pancolitis (Montreal-Klassifikation, siehe Tabelle 1.2.).²⁵ Weitere Klassifikationssysteme auf der Grundlage des endoskopischen und klinischen Bildes sind der Mayo-Score, der „Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity“ (UCEIS) und die Einteilung in leichte, moderate und schwere Kolitis nach Truelove und Witts. ^{25,27}

Einteilung	Ausdehnung	Beschreibung
E1	Proktitis	Limitiert auf das Rektum (distal des rektosigmoidalen Übergangs)
E2	Linksseitencolitis	Befall bis zur linken Flexur
E3	ausgedehnte Colitis	Ausdehnung über die linke Flexur hinaus bis zur Pancolitis

Tabelle 1.2. Die Montreal-Klassifikation der Colitis ulcerosa

(aus „Aktualisierte AWMF-S3-Leitlinie Colitis ulcerosa“ der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs-und Stoffwechselkrankheiten (DGVS))²⁵

Die Therapie der CU richtet sich nach Schweregrad und Ausdehnung der Entzündung sowie nach dem Erkrankungsverlauf und Präferenzen des Patienten.²⁵ Das Ziel der medikamentösen Therapie ist das Erreichen und die Aufrechterhaltung von Remissionsphasen.²⁵ 5-Aminosalizylate (5-ASA) und Steroide in topischer oder systemischer Verabreichung bilden die Basis der Therapie im Schub.²⁵ Zudem können Azathioprin, Tumor Nekrose Faktor-(TNF)-Antikörper und Integrin-Antikörper eingesetzt werden.²⁵ Zum Remissionserhalt kommen 5-ASA-Präparate, Azathioprin, TNF- oder Integrin-Antikörper und Probiotika zum Einsatz.²⁵ Eine mukosale Heilung kann in Remissionsphasen nachweisbar sein und ist mit besserem klinischen Outcome assoziiert.²⁸ Bei therapierefraktärer fulminanter Colitis sowie bei nicht stillbaren, relevanten Blutungen, Stenosen, Perforationen und Karzinomen ist eine chirurgische Therapie indiziert.²⁵ Dabei wird die Durchführung einer restaurativen Proktokolektomie mit ileopouchanaler Anastomose empfohlen.²⁵

Mit der CU assoziierte Erkrankungen sind die Primär Sklerosierende Cholangitis, Arthritiden, Hautveränderungen und Entzündungen im Bereich der Augen.²³ Es besteht ein erhöhtes Karzinomrisiko bei Patienten mit CU im Vergleich zu der Normalbevölkerung.²⁵

1.2.2. Karzinomrisiko bei Colitis ulcerosa

Die Wahrscheinlichkeit, ein cCRC zu entwickeln, steigt mit fortschreitender Ausdehnung und Dauer der Entzündung.²⁹ Älteren Studien zufolge liegt das Karzinomrisiko von Patienten mit CU nach 10-jähriger Erkrankungsdauer bei 2%, nach 20-jähriger Erkrankungsdauer bei 8% und nach 30-jähriger Erkrankungsdauer bei 18%. Neuere Studien beschreiben allerdings ein geringeres Risiko.^{29,30} Dies kann auf eine effektivere Entzündungshemmung sowie auf bessere Früherkennungsprogramme zurückgeführt werden.^{25,30} Anti-inflammatorische Therapien führen demnach zu einer Reduktion des cCRC.³¹

1.2.3. Pathogenese des Colitis ulcerosa-assoziierten Kolonkarzinoms

Die chronische Entzündung führt zu einer Gewebeschädigung, wodurch andauernde Reparatur- und Regenerationsreize auf das Epithel einwirken.³² Die hohe Zellteilungsrate bedingt ein erhöhtes Fehlerpotential, sodass die Wahrscheinlichkeit von Replikationsfehlern und Mutationen steigt.³³ Der im Entzündungsmilieu erhöhte oxidative Stress verursacht direkte DNA-Schäden.³² Proinflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren haben zudem direkte onkogene Effekte auf die Zellen, hemmen die Apoptose und fördern die Angiogenese.^{33,34} Auf molekulargenetischer Ebene relevante Signalkaskaden mit karzinogener Wirkung sind: TNF- α über die Induktion von Interleukinen (IL) und der Cyclooxygenase-2 (COX-2), die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren „Signal transducer and activator of transcription 3“ (STAT3) und „nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells“ (NF κ B) sowie die Aktivierung des WNT-Signalwegs und die Hypermethylierung von CpG-Inseln. Daraus kann die Genmodifikation von Tumorsuppressorgenen resultieren.^{32,34} Es ist davon auszugehen, dass der Zustand der chronischen Entzündung an mehreren Stellen des betroffenen Kolons zu onkogenen Mutationen führt, sodass im Sinne einer Feldkanzerisierung bei CU simultan multifokale Dysplasien als Präkanzerosen entstehen.^{32,35} Jeweils ausgehend von einer mutierten Stammzelle mit Selektionsvorteil und Proliferationsbeschleunigung breitet sich ein veränderter Zellklon zunächst innerhalb einer Krypte und später kryptenübergreifend aus.³⁵

1.2.4. Karzinogenese: Die Dysplasie-Karzinom-Sequenz

Die Entstehung des cCRC verläuft nicht gemäß der Adenom-Karzinom-Sequenz des sCRC.³¹ Im Rahmen der CU entsteht das Karzinom auf dem Boden der chronischen Entzündung über die Dysplasie als Präkanzerose, sodass von einer Dysplasie-Karzinom-Sequenz gesprochen wird.³²

Der Verlauf der Dysplasie-Karzinom-Sequenz ist geprägt durch die Ansammlung spezieller Mutationen, ähnlich wie die Adenom-Karzinom-Sequenz des sCRC.³⁵ Unterschiede finden sich besonders in der Reihenfolge und Ausprägung dieser molekulargenetischen Aberrationen.³⁵ Frühe Ereignisse der Karzinogenese des cCRC sind die p53-Überexpression und Mikrosatelliteninstabilität, welche die maligne Transformation initiieren.^{16,36,37} Mutationen oder Heterozygotieverlust von p53 lassen sich teilweise in entzündeter Mukosa ohne dysplastische Veränderungen nachweisen und bilden demnach einen sehr frühen Schritt der cCRC-Entstehung.³² Weitere frühe Faktoren der Karzinogenese sind Aneuploidie, Hypermethylierung und Mikrosatelliteninstabilität.³² Im folgenden Verlauf der Dysplasieprogression bedingen Deletionen auf 18q oder der Verlust des kompletten Chromosomarms 18q den Ausfall der Tumorsuppressorgene DCC und DPC4 (=SMAD4).^{38,39} Eher späte Ereignisse sind die RAS-Mutation und APC-Resistenz.^{16,31,40}

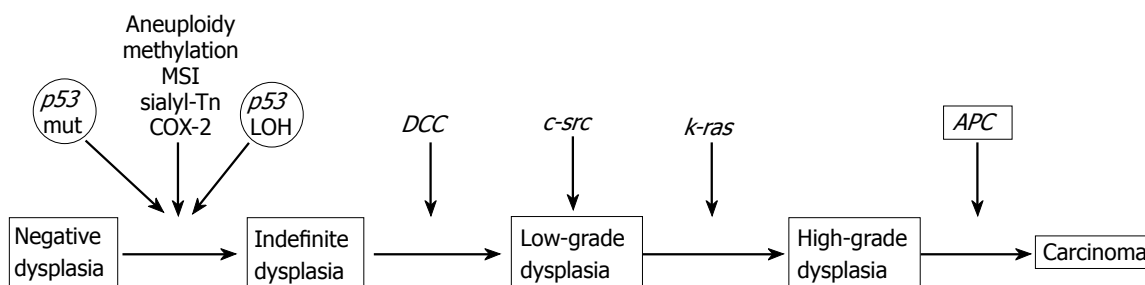


Abbildung 1.2. Die Dysplasie-Karzinom-Sequenz

(aus „Cancer in inflammatory bowel disease“ von Xie und Itzkowitz 2008¹⁶)

Darstellung der Abfolge molekularer Ereignisse, welche die Entstehung des cCRC.

1.2.5. Diagnostik und Früherkennung

Da das cCRC über die Dysplasie als Präkanzerose entsteht, sieht die Leitlinie regelmäßige Überwachungskoloskopien mit Entnahme von Gewebeproben als Screening auf Vorstufen und Karzinome vor.²⁵ Die Diagnose der Dysplasie bedeutet die Identifikation einer Präkanzerose

und stellt einen akuten Behandlungsbedarf zur Verhinderung der Entstehung eines Karzinoms dar.⁴¹ Eine geringgradige Dysplasie birgt bereits ein 9-fach erhöhtes Karzinomrisiko, während dieses Risiko bei einer high-grade Dysplasie sogar 12-fach erhöht ist.⁴² Ein frühzeitiger Nachweis der Dysplasie ist demnach essentiell, um dem Patienten die Progression zum Karzinom und alle diesbezüglichen Konsequenzen zu ersparen.²⁵ Deshalb werden bei Patienten mit CU regelmäßige Überwachungskoloskopien mit der Entnahme von ungezielten Biopsien („random biopsies“) sowie gezielten Biopsien aus auffälligen Darmbereichen durchgeführt.²⁵ Teils ist der endoskopische Nachweis der Dysplasie schwierig, besonders flache dysplastische Läsionen können übersehen werden.⁴¹ Zusätzlich kann eine Chromoendoskopie angewandt werden, wobei die Farbstoffe Methylenblau oder Indigokarmin mukosal appliziert werden, um epitheliale Läsionen bei der Koloskopie besser sichtbar zu machen.⁴³

Die endoskopische Einteilung auffälliger Läsionen erfolgt in polypoide und nicht-polypoide Läsionen, orientiert an der Pariser Klassifikation.^{25,44} Die Bezeichnungen „Adenom-assoziierte Läsion oder Masse“ (ALM) und „Dysplasie-assoziierten Läsion oder Masse“ (DALM) werden aktuell nicht mehr empfohlen.²⁵

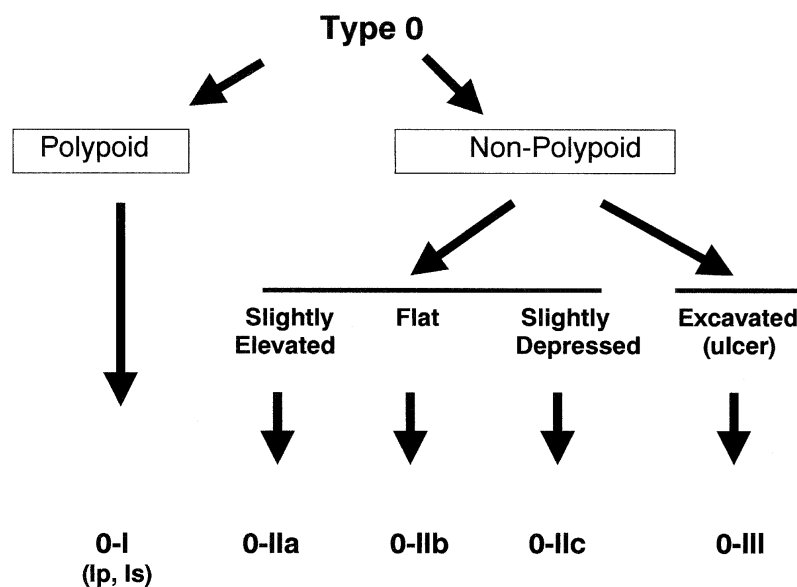


Abbildung 1.3. Die Pariser Klassifikation

(aus „The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon“)⁴⁴

Die Pariser Klassifikation unterscheidet orientierend an der Japanese Gastric Cancer Association die Typen 0-5. Dabei beschreiben Typ 1-4 karzinomatöse Veränderungen, Typ 5 unklassifizierte Karzinome und Typ 0 oberflächliche nicht-invasive Läsionen. Polypoide Läsionen ragen über die Mukosa heraus und werden ferner in gestielt (lp) und sessil (ls) unterteilt. Oberflächliche nicht-polypoide Läsionen sind leicht erhaben (IIa), flach (IIb) oder leicht eingesenkt (IIc). Davon zu unterscheiden sind tiefe nicht-polypoide, ulcerierte Läsionen (III).

Nach der Gewebeentnahme wird die Diagnose der Dysplasie histologisch durch den Pathologen gestellt, wobei infolge der hohen Untersuchervariabilität und der großen Konsequenz der Diagnose eine Zweitbeurteilung durch einen weiteren unabhängigen Pathologen erfolgen sollte.²⁵ Die Dysplasie, auch IEN genannt, bezeichnet die Ansammlung von atypischen Zellen ohne Überschreitung der Basalmembran und ohne die Fähigkeit der Invasivität.²⁵ Die histopathologische Einteilung erfolgt anhand der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in high-grade, low-grade und unklare/indefinite IEN.²⁵ Die histopathologische Einstufung der Dysplasie kann in frühen Stadien teils nicht eindeutig getroffen werden, da der Übergang von Entzündung zu Dysplasie ein fortlaufender Prozess ist.⁴¹ Schwierigkeiten bestehen besonders bei der Unterscheidung von reaktiven und regenerativen zu dysplastischen Epithelveränderungen aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit sowie bei der Beurteilung hinsichtlich des kompletten Ausmaßes der Veränderungen, wenn die Biopsie nur aus kleinen Gewebemengen besteht oder die Läsion nicht vollständig erfasst wurde.⁴¹ Ki-67- und p53-immunhistochemische Färbungen können im Rahmen der Einschätzung dysplastischer Veränderung in Einzelfällen nützlich sein.⁴¹

Zelluläre Merkmale der low-grade Dysplasie beinhalten eine Vergrößerung und Hyperchromatie der Zellkerne, basale Streifung und vergrößerte Zellen.⁴¹ Eine verminderte Anzahl an Becherzellen und dystrophe Becherzellen sind zwar Merkmale der Dysplasie, allerdings ebenfalls bei entzündlich veränderter Mukosa reduziert vorhanden, sodass hieran eine Unterscheidung nicht immer möglich ist.⁴¹ Im Gegensatz zu regenerierender Mukosa reichen die Veränderungen bei der Dysplasie bis an die luminale Oberfläche.⁴¹ Die high-grade Dysplasie zeichnet sich durch eine stark gestörte Kryptenarchitektur sowie Abnormitäten in allen Kryptenabschnitten aus.⁴¹ Es bestehen ein zellulärer Polaritätsverlust und stark ausgeprägte nukleäre Abweichungen, welche Hyperchromatie, eine Stratifizierung bis in oberflächliche Kryptenabschnitte und eine erhöhte Kern-Zytoplasma-Relation umfassen.⁴¹

1.2.6. Therapie der Colitis ulcerosa-assoziierten Dysplasie und des Colitis ulcerosa-assoziierten Karzinoms

Bei histopathologischem Nachweis einer CU-assoziierten Dysplasie wird, sofern technisch möglich, die komplette endoskopische Resektion empfohlen.²⁵ Die Diagnose einer high-grade Dysplasie durch den Pathologen indiziert laut Leitlinie eine Proktokolektomie, während der Nachweis einer low-grade Dysplasie eine relative Proktokolektomieindikation ist und alternativ durch engmaschige Koloskopien und Biopsieentnahmen überwacht werden kann.²⁵ Bei dem

Nachweis eines cCRC ist die Proktokolektomie immer die Therapie der Wahl, da hier ein erhöhtes Risiko für syn- und metachrone Zweitkarzinome besteht.²⁵

Eine effektive antiinflammatorische Therapie kann eine Reduktion des Karzinomrisikos von CU Patienten um bis zu 45% bedeuten.^{45,46} Dabei ist nicht nur eine makroskopische, sondern bestenfalls eine mikroskopische Heilung, ein sogenanntes „mucosal healing“ anzustreben, welches als histologisch nachgewiesene, entzündungsfreie Mukosa definiert ist.^{28,47}

1.3. Insulinrezeptor und Insulin/Insulin-like growth factor-System

1.3.1. Insulin

Insulin ist ein Proteohormon, das in den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas gebildet wird ⁴⁸. Als Hauptregulator des Blutglukosespiegels, mit Glucagon als Gegenspieler, nimmt Insulin Einfluss auf sämtliche Stoffwechselprozesse des Körpers.^{48,49} Ein kurzzeitiger Effekt ist die Senkung des Blutzuckerspiegels, langfristig kommt es zum Eingriff in die Proteinbiosynthese und Genexpression von Enzymen, Rezeptoren und anderen, an der Signaltransduktion beteiligten Proteinen.⁵⁰ Insgesamt fördert Insulin anabole Stoffwechselprozesse, Wachstum und Differenzierung.⁵¹

Auf Chromosom 11 befindet sich das Insulingen, welches zunächst für das Vorläufermolekül Präproinsulin codiert.^{52,53} Diese Peptidkette setzt sich zusammen aus einer Signalsequenz, gefolgt von der B-Kette, dem C-Peptid und der A-Kette.^{53,54} Durch posttranslationale Modifikation wird über mehrere Zwischenstufen das Endprodukt Insulin synthetisiert, wobei das C-Peptid abgespalten wird.^{55,56}

Die Speicherung der Insulinmoleküle erfolgt als hexamere Zinkkomplexe in Vesikeln der pankreatischen β -Zellen.⁵⁷ Die extrazelluläre Glukosekonzentration im Blut wirkt sich direkt auf die Expression sowie auf die Sekretion des Insulins aus.⁴⁸ Durch die vermehrte Glukoseaufnahme über Glukosetransporter Typ 2 (GLUT-2) und die anschließende Metabolisierung der Glukose steigt die Konzentration von Adenosintriphosphat (ATP) in der β -Zelle.⁴⁸ Die ATP-abhängige Depolarisation führt zu einem Calcium-Einstrom in die β -Zelle, woraufhin die Insulinsekretion ausgelöst wird.⁴⁸ Darüber hinaus fördert das „Glucagon-like-Peptide 1“, welches durch Glukose und Fettsäuren stimuliert wird, die Insulinsekretion.⁴⁸

1.3.2. Der Insulinrezeptor: Aufbau und zelluläre Wirkweise

Vermittelt werden die Effekte von Insulin über den Insulinrezeptor (IR), ein integrales Membranprotein mit Tyrosin-Kinase-Aktivität.^{58,59} Der Rezeptor ist als Tetramer ($\alpha_2\beta_2$) aufgebaut, bestehend aus zwei homologen Rezeptormolekülen ($\alpha_1\beta_1$).⁶⁰ Jeder dieser Dimere wiederum setzt sich zusammen aus einer α -Untereinheit und einer β -Untereinheit.⁵⁸

Die α -Untereinheit ist ausschließlich extrazellulär lokalisiert und enthält die Ligandenbindungsstelle.⁵⁸ Durch Disulfidbrücken zwischen den beiden α -Ketten zweier Rezeptormoleküle entsteht der tetramere Gesamtrezeptor.⁶¹ Es wird davon ausgegangen, dass auf jeder α -Kette zwei Bindungsdomänen für Liganden lokalisiert sind, jeweils eine Domäne mit niedriger Affinität („low-affinity site“ = Bindungsstelle 1) und eine Domäne mit hoher Affinität („high-affinity site“ = Bindungsstelle 2).⁶² Ein Insulinmolekül bindet an die Bindungsstelle 1 der einen α -Kette und die Bindungsstelle 2 der anderen α -Kette, wodurch der Rezeptor aktiviert wird.⁶² Durch Bindung eines zweiten Insulinmoleküls an die jeweils gegensätzlichen, freien Bindungsstellen entsteht das Phänomen der negativen Kooperativität.^{62,63} Die Dissoziation von Insulin und IR wird beschleunigt, indem die erste Insulin-IR-Bindung durch die zweite Ligandenbindung gelockert und der gesamte Rezeptor-Insulin-Komplex destabilisiert wird.^{63,64} Hohe Insulinkonzentrationen bewirken somit eine schnellere Liganden-Rezeptor-Dissoziation und neue Insulinbindung an den Rezeptor.^{63,64}

Die β -Untereinheit ist jeweils an ihrem extrazellulären Anteil über Disulfidbrücken mit der α -Untereinheit verknüpft.⁶¹ Sie beinhaltet den transmembranären Teil des Rezeptors und ist für die Integration in die Zellmembran zuständig.⁵⁸ Der größte Anteil der β -Kette befindet sich intrazellulär, wo die wichtigen Domänen der Signaltransduktion lokalisiert sind.⁵⁸ Hier liegt die Tyrosin-Kinase-Domäne, umgeben von regulatorischen Abschnitten sowie Bindungsstellen für weitere Signalmoleküle.⁶⁵

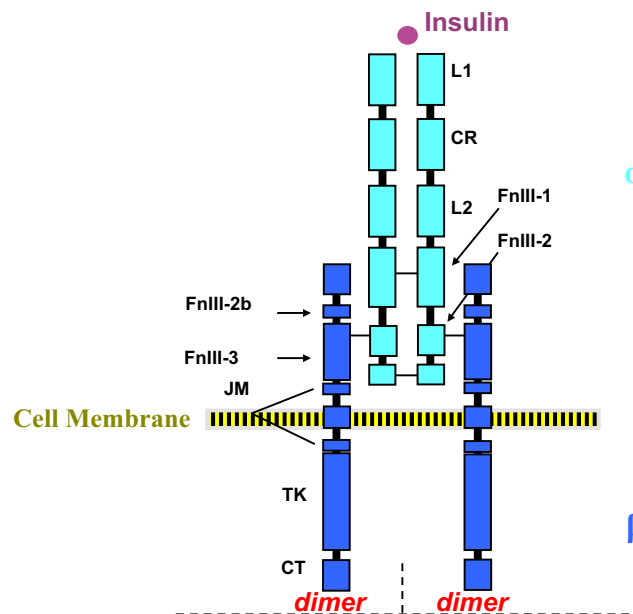


Abbildung 1.4. Der Insulinrezeptor

(aus „Insulin, Insulin Receptors and Cancer“ von Vigneri et al. 2016)⁴⁹

Jede dimere Peptidkette des Insulinrezeptors lässt sich in verschiedene Abschnitte unterteilen: Zwei große Domänen (large domains = L1, L2), eine Cysteinreiche Domäne (CR), vier Fibronectin Typ 3 Domänen (FnIII-1, FnIII-2, FnIII-2b, FnIII-3), eine Juxtamembranäre Domäne (JM), eine Tyrosinkinase Domäne (TK) und das Carboxyl-Ende (CT). Dabei besteht jeder Dimer aus der α-Kette (hellblau) und β-Kette (dunkelblau).

Die Ligandenbindung an den extrazellulären Rezeptorteil führt zu einer Konformationsänderung des gesamten Rezeptormoleküls.⁶⁶ Die stereotaktische Inhibition der Tyrosin-Kinase-Domäne durch die α-Untereinheit wird aufgehoben und die beiden β-Untereinheiten werden näher zusammengeführt.^{67,68} In Form einer trans-Autophosphorylierung wird der Rezeptor vollständig aktiviert, indem die nun aktivierten Tyrosin-Kinase-Domänen ATP-abhängig drei Tyrosinreste der jeweils anderen β-Untereinheit phosphorylieren.⁶⁶ Es werden Ligandenbindungsstellen freigelegt, an denen Adaptermoleküle andocken und ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert werden.⁶⁹ Wichtige Signalmoleküle sind dabei die Insulinrezeptorsubstrate (IRS), IRS-1 bis IRS-6 sowie die Proteine „Src Homology 2 containing protein 1“ (Shc) und „Casitas B-lineage Lymphoma“ (Cbl).⁷⁰ Die IRS werden durch zahlreiche Faktoren beeinflusst und zeigen eine gewebespezifische Verteilung.^{70,71} An sie binden wiederum weitere intrazelluläre Moleküle und ein vielfältiges Netzwerk aus Signalkaskaden wird in Gang gesetzt.⁷⁰

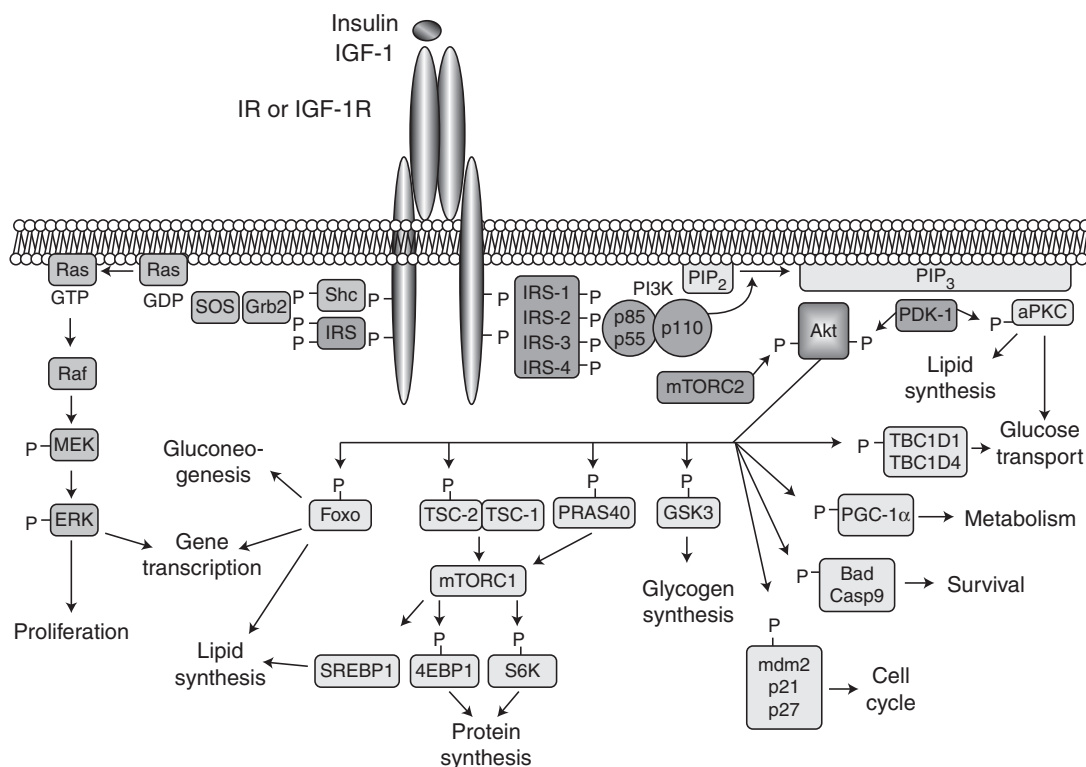


Abbildung 1.5. Die Signalkaskaden des Insulinrezeptors

(aus „Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States“ von Boucher, Kleindridders und Kahn)⁷⁰

Graphische Darstellung des komplexen Netzwerks der IR-Wirkung. Die Aktivierung des IR durch die unterschiedlichen Liganden löst weitreichende intrazelluläre Signalkaskaden aus.

Als zentraler Punkt der Transduktion des IR agiert die Proteinkinase B (Akt), welche hauptsächlich metabolische Effekte vermittelt, aber auch an der Regulation der Genexpression beteiligt ist.⁷⁰ Nach Aktivierung von Akt durch die Phosphoinositid-Kinase 3 (PI3K) wird über die Akt-vermittelte Phosphorylierung von den Akt-Substraten TBC1D4 und TBC1D1 die Aufnahme von Glukose in die Zellen durch die Transposition des GLUT-4 an die Zellmembran von Muskel und Fettzellen gesteigert.⁷² Akt-unabhängig verläuft die GLUT-4-Transposition daneben über die Proteinkinase C (PKC) sowie über die Rekrutierung der Ubiquitinligase Cbl.^{69,70,73}

Relevante metabolische Wirkungen durch Akt-Phosphorylierung bestehen aus der Inaktivierung der Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) und folgend aus der Steigerung der Glykogensynthese in den Hepatozyten, und der Blockierung der Transkriptionsfaktoren der Forkhead-Box-Protein-O-Gruppe (FOXO).^{62,65} Dies führt zu einer Reduktion der Glukoneogenese und Lipogenese (Triglyceridsynthese/-sektion) sowie zu der Hemmung mitogener, anti-apoptotischer und proliferativer Effekte.⁶⁵ Die Phosphorylierung der Phosphodiesterase 3B (PDE3B) bewirkt die Hemmung der Lipolyse in Adipozyten.⁷⁰ Ein direkter Einfluss auf die Proteinsynthese entsteht durch die Aktivierung von „Mechanistic

Target of Rapamycin“ (mTOR) infolge der Aufhebung der „proline-rich AKT substrate of 40 kDa“ (PRAS40)-Inhibition sowie der Hamartin/Tuberin-Komplex-Auflösung.^{70,74} Hamartin (Tuberous Sclerosis Complex 1 = TSC1) und Tuberin (Tuberous Sclerosis Complex 2 = TSC2) sind Tumorsuppressorproteine, die als Komplex wirksam sind.⁷⁴ Überdies werden mittels Akt direkte Effekte bis in den Zellkern vermittelt und der Zellzyklus beeinflusst.⁷⁰ Die Phosphorylierung des Murine-Double-Minute-Onkogens 2 (mdm2) führt zur Inhibition des Tumorsuppressors p53 und dementsprechend zur Apoptosehemmung.⁷⁰ Die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren, wie NFκB und Zellzyklusinhibitoren, wie die Proteine „Bcl-2-associated X Protein,“ (BAX) und Bcl-2-Antagonist of Cell Death“ (BAD), fördert ebenfalls das Zellwachstum, Zellüberleben und wirkt anti-apoptotisch.^{70,75}

Unabhängig von Akt führt eine Kaskade über Shc und „Growth factor receptor-bound protein 2“ (Grb2) als Verbindungsproteine, sodass „Son of Sevenless“ (SOS) an den IR gelangt und aktiviert wird.^{49,76} SOS ist ein Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor für das G-Protein „rat sarcoma“ (RAS) und führt wiederum zu dessen Aktivierung.⁷⁷ Im Folgenden führt die Kaskade über die Proteinkinase „rapidly accelerated fibrosarcoma“ (RAF) sowie über die „Mitogen-activated protein kinase kinase“-1 und -2 (MEK-1 und -2) zu der Aktivierung der MAP-Kinasen „Extracellular-signal regulated kinases“ Isoform 1 und 2 (ERK-1 und -2).⁷¹ Diese haben Einfluss auf die Genexpression, auf die Zellproliferation und Zelldifferenzierung sowie extranukleäre Effekte durch kovalente Modulation mittels Phosphorylierung des Zytoskeletts.⁷⁶

Nach Insulinbindung, Autophosphorylierung und Signaltransduktion kommt es zu der Internalisierung des Insulin-Rezeptorkomplexes.⁷⁸ Durch Endozytose werden Vesikel gebildet, in denen der pH-Wert mittels Protonenpumpen von 7,4 auf ca. 5,0 gesenkt wird, wodurch es zu einer Dissoziation von Insulin und IR kommt.^{79,80} Der Rezeptor kann daraufhin dephosphoryliert und zur erneuten Verwendung zurück in die Zellmembran integriert werden, während das Insulinmolekül proteolytisch abgebaut wird.⁸¹ Die Endozytose des IR kann Clathrin-abhängig als auch Clathrin-unabhängig vermittelt werden.⁵¹ Dabei scheint hierdurch der weitere Weg des Rezeptors, also Abbau oder erneute membranäre Expression, beeinflusst zu werden.⁵¹ Angesichts der präferentiellen Aktivierung des ERK-Signalwegs durch Clathrin-unabhängige Endozytose wird zudem ein Einfluss auf die Signaltransduktion vermutet.⁵¹

1.3.3. Die Isoformen des Insulinrezeptors

Das Gen für den IR befindet sich auf Chromosom 19 und enthält 22 Exons.^{82,83} Davon kodieren je 11 Exons für die α -Kette und 11 Exons für die β -Kette.⁸³ Das zunächst einkettige Vorläuferpeptid wird posttranslational modifiziert, indem es unter anderem proteolytisch in die α - und β -Kette gespalten wird, die Disulphidbrücken eingebaut werden und eine Glykosylierung stattfindet.⁶⁵ Durch alternatives Splicing können zwei verschiedene Isoformen des Rezeptormoleküls hergestellt werden.^{83,84} Das Exon 11 der α -Kette ist Bestandteil von Isoform B (IR-B), während es bei Isoform A (IR-A) nicht enthalten ist, sodass dessen α -Kette um 12 Aminosäuren am C-Terminus verkürzt ist.^{65,83} Der tetramere IR kann sich als homologer Rezeptor aus jeweils zwei IR-A-Dimeren oder aus zwei IR-B-Dimeren bilden.⁶⁵ Zudem ist die Bildung eines heterologen Rezeptors möglich, bei dem ein IR-A-Dimer mit einem IR-B-Dimer kombiniert ist.⁶⁵

Die Expression des IR wird durch multiple Faktoren auf den Ebenen der Transkription, Translation und posttranslationalen Modifikation gesteuert.⁵¹ An der Regulation der Transkription sind nukleäre Proteine, unter anderem auch p53 und FOXO, beteiligt.⁵¹ Spezifische Boten-Ribonukleinsäuren (mRNA) und mikro-Ribonukleinsäuren (miRNA) wirken darüber hinaus auf die Synthese des Rezeptors.⁵¹ Letztere weisen eine gewebespezifische Verteilung auf und angesichts ihrer Hochregulation im Rahmen von Übergewicht scheinen sie an der dysregulierten IR-Expression und der Entstehung von Insulinresistenz beteiligt zu sein.⁵¹ Regulatorische Elemente auf Intron 10 und Exon 11 regulieren zusammen mit Splicingfaktoren die Expression der IR-Isoformen.⁵¹ Ein Einfluss durch Wachstumsfaktoren, wie auch Insulin selbst, wird angenommen.⁵¹ IR-A und IR-B weisen gewebeabhängig spezifische Expressionsmuster auf.^{85,86} Der strukturelle Unterschied der Isoformen bewirkt, dass jeweils individuelle Ligandenbindungsmuster bestehen und Signalkaskaden mit unterschiedlicher Gewichtung ausgelöst werden.⁵¹

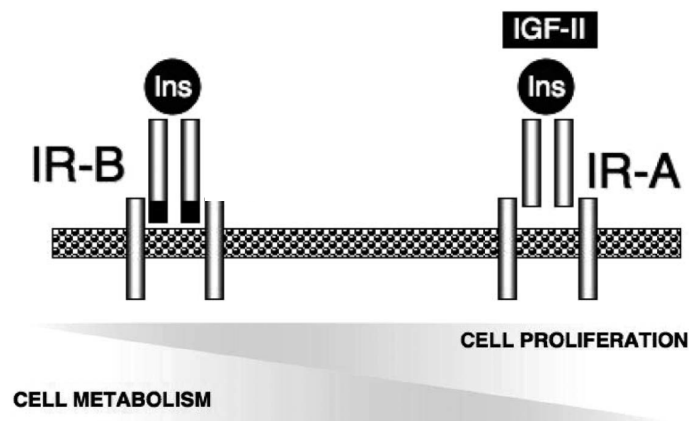


Abbildung 1.6. Die Isoformen des Insulinrezeptors

(modifiziert aus „The Role of Insulin Receptors and IGF-I Receptors in Cancer and other Diseases“ von Frasca et al. ⁷⁷)

Die beiden Isoformen des IR unterscheiden sich durch 12 Aminosäuren, welche durch das Exon 11 kodiert werden. Es ist bei dem IR-B enthalten, während es bei dem IR-A fehlt. Dies bedingt weitreichende Unterschiede in Expression, Ligandenbindung und Wirkung der IR-Isoformen.

In den typischen Zielgeweben von Insulin, wie z.B. Muskel-, Fett- und Lebergewebe, ist der IR-B vorherrschend.⁶⁵ Diese Isoform ist in differenziertem Gewebe dominierend und bedingt den Differenzierungsprozess der Zellen.⁷⁵ Der IR-B wird als der spezifische Rezeptor für Insulin angesehen, denn im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren des Insulin/„Insulin-like growth factor“ (IGF)-Systems wird vorrangig Insulin als Ligand gebunden.⁴⁹ Eine Aktivierung von IR-B führt zu den typischen metabolischen Wirkungen von Insulin, wie z.B. GLUT-4-Transposition an die Zelloberfläche in der Muskulatur und Steigerung der Glykogensynthese in den Hepatozyten.⁴⁹

Der IR-A vermittelt hingegen verstärkt mitogene und anti-apoptotische Effekte.⁸⁷ Es werden durch Ligandenbindung präferenziell Signalkaskaden ausgelöst, die bis in den Zellkern reichen und die Proteinbiosynthese beeinflussen.^{65,88} Über den Grb/SOS-Komplex, die RAS-Kaskade und den MAP-Kinase-Weg werden Proliferation, Zellmigration und verlängertes Zellüberleben vermittelt.^{49,65} Darüber hinaus kommt es vorwiegend bei der Aktivierung des IR-A, nicht aber des IR-B, zur Translokation von IRS-1 in den Zellkern.⁸⁹ Der IRS-1-Weg wirkt anti-differenzierend sowie proliferativ auf die Zelle und ist ebenfalls ein Teil der Signaltransduktion des IGF-Systems.^{87,89}

Die wachstumsfördernde Wirkung des IR-A spielt eine entscheidende Rolle im pränatalen Organismus, wo der IR-A vorherrscht und ebenfalls als funktioneller Rezeptor für „Insulin-like growth factor 2“ (IGF-2) fungiert.⁸⁸ Der IR-A bindet zusätzlich zum eigentlichen Liganden Insulin auch IGF-2 mit entsprechender Affinität.^{64,90} Besonders durch IGF-2 als typischen Wachstumsfaktor werden mitogene Signalkaskaden ausgelöst.⁸⁸ Allerdings konnte

experimentell gezeigt werden, dass sowohl ein Fehlen des IR als auch ein Insulinmangel zu einer embryonalen Wachstumsminde rung führen.⁹¹ Daraus lässt sich schließen, dass nicht nur IGF-2, sondern auch Insulin selber pränatal über den IR-A proliferative Effekte vermittelt und für das Körperwachstum essentiell ist.⁷⁷

Es existiert außerdem noch ein weiterer Ligand für den IR-A:⁶⁵ Proinsulin, also eine Insulinvorstufe, zirkuliert vermehrt im embryonalen und fetalen Organismus und zeigt ein ähnliches Bindungsmuster wie IGF-2, sodass in erster Linie der IR-A als Rezeptor fungiert.⁹² Ausgelöst werden überwiegend mitogene und proliferative Signalkaskaden wie der SOS/ERK-Weg und weniger metabolische Effekte über Akt.⁹² Da Proinsulin im adultem Kreislauf nur in geringen Konzentrationen vorhanden ist, scheint es fast ausschließlich pränatal relevant zu sein.⁹² Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 konnte allerdings eine bis zu fünffach erhöhte Konzentration im Blutkreislauf nachgewiesen werden.⁹²

Die vorherrschende Präsenz des IR-A in undifferenziertem Gewebe, wie es embryonal und fetal vorkommt, korreliert mit den Beobachtungen, dass der IR-A vermehrt von Tumorzellen exprimiert wird.⁸⁸ So wurde unter anderem eine Überexpression des IR-A bei Prostata-, Mamma- und Kolonkarzinomen festgestellt.^{77,90,93} Auch hier beeinflusst der IR-A Wachstum, Zellzyklus und Apoptose.⁷⁷

1.3.4. Das Insulin/Insulin-like growth factor-System

Das System der insulinähnlichen Wachstumshormone steht in engem Zusammenhang mit dem Insulinsystem.⁹⁴ Dazu gehören zwei Liganden, „Insulin-like growth factor 1“ (IGF-1) und „Insulin-like growth factor 2“ (IGF-2), sowie zwei Rezeptoren, IGF-1-Rezeptor (IGF-1R) und IGF-2-Rezeptor (IGF-2R).^{95,96} Durch die strukturellen Ähnlichkeiten der Liganden sowohl mit Insulin als auch des IGF-1R mit dem IR gibt es große Überschneidungen, sodass von einem Insulin/IGF-System gesprochen wird.^{94,97}

Der Aufbau der insulinähnlichen Wachstumsfaktoren zeigt große Übereinstimmung mit dem Insulinmolekül, wodurch die Peptide zu ihrem Namen gekommen sind.^{95,98} Die Peptidketten der beiden IGF-Moleküle selbst variieren in der Länge um nur 3 Aminosäuren, wobei die Sequenzen zu 62% homolog sind.⁹⁹ Die IGF-Moleküle enthalten Bindungsstellen für IGF-Bindungs-Proteine (IGFBP).^{100,101} Die sechs verschiedenen IGFBP binden an die IGF-Moleküle im zirkulierenden Blut und regulieren darüber deren Aktivität und Verfügbarkeit.^{100,101}

IGF-1 und IGF-2 werden größtenteils in der Leber synthetisiert, daneben entsteht durch die lokale Produktion von IGFs im Gewebe auch eine parakrine Wirkung.^{96,102} Die hepatische Produktion von IGF-1 steht unter dem Einfluss des Wachstumshormons Somatotropin (= „Growth Hormone“), denn IGF-1 übermittelt einen Großteil der wachstumsfördernden Effekte des Somatotropin.¹⁰³ Während die Hauptaufgabe von Insulin die Regulation von Stoffwechselabläufen ist, nehmen die IGFs vornehmlich Einfluss auf Wachstum und Zellüberleben.⁶⁹

IGF-1 wirkt stimulierend auf Zellwachstum und -differenzierung im adulten Körper.⁹⁶ So bewirkt IGF-1 sowohl die Muskelzellproliferation, als auch die Differenzierung von Myoblasten zu Myozyten.¹⁰⁴ Des Weiteren fördert IGF-1 das Skelettwachstum über vielfältig stimulierende Effekte auf Chondroblasten und Osteoblasten.¹⁰⁵ Als Proliferationsstimulus beeinflusst IGF-1 den Zellzyklus und ermöglicht das Voranschreiten in der G1-Phase.¹⁰⁶ Darüber hinaus hat IGF-1 insulinähnliche, metabolische Wirkungen und erhöht die Insulinsensitivität des Gewebes.^{107,108} Dabei werden die anti-lipolytischen Effekte vermutlich nur über den IGF-1R direkt ausgelöst, während die Senkung des Blutzuckerspiegels und der Einfluss auf den Proteinstoffwechsel ebenfalls durch Aktivierung des IR erfolgt.¹⁰³

IGF-2 hat eine bedeutende Rolle für das pränatale Körperwachstum.¹⁰⁹ Knock-out Mäuse, mit inaktiviertem IGF-2 zeigten im Vergleich zu normalen Mäusen ein embryonales Wachstumsdefizit von bis zu 60%.¹⁰⁹ Im gesunden adulten Körper spielt IGF-2 nur noch eine untergeordnete Rolle, obwohl die Serumkonzentration von IGF-2 höher ist als die des IGF.¹¹⁰ Dies lässt sich einerseits durch die 6-fach höhere Affinität von IGF-1 zum IGF-1R erklären und andererseits durch die höhere Affinität von IGF-2 zu den IGFBP, wodurch die Rezeptorbindung verhindert wird.¹¹⁰ Durch genomisches Imprinting ist das Gen auf dem maternalen Chromosom inaktiv, wodurch die Aktivität im adulten Organismus nur durch die paternale Version des Gens bestimmt wird.¹¹¹

Der IGF-1R übermittelt die wachstumsstimulierenden Effekte beider IGFs und wird im humanen Körper ubiquitär exprimiert.¹⁰⁴ Er zeigt eine große Ähnlichkeit in Form und Struktur mit dem IR.¹¹² Die Grundlage dafür liegt in der Entwicklung der beiden Rezeptoren, denn sie sind evolutionär aus einem Vorläufergen entstanden und ähneln stark in der Primärstruktur.⁶⁵ Größere Unterschiede zeigen die Ligandenbindungsdomänen auf der jeweiligen α -Kette, wodurch das verschiedene Bindungsmuster der Liganden erklärt werden kann.⁹⁷ Hier liegt gleichwohl immer noch eine Homologie von fast 50% vor.⁹⁷ Diese strukturelle Übereinstimmung ermöglicht die Bindung der Liganden Insulin und IGF-2 an beide Rezeptoren.¹¹³ Unterschiede bestehen in der Affinität: Der IGF-1R bevorzugt IGF-1 und IGF-2, Insulin kann aber mit reduzierter Affinität von 1/500 bis 1/1000 binden.¹¹³ Besonders bei hohen Insulinkonzentrationen im Blut kommt es zu einer Spill-Over-Aktivierung des IGF-1R

durch Insulin.⁷⁷ An den IR-B bindet fast ausschließlich Insulin, an den IR-A hingegen binden Insulin und IGF-2 mit ähnlicher Affinität (1/10) und IGF-1 mit einer vergleichsweise niedrigeren Affinität.^{88,113}

Rezeptor	Affinität der Liganden				
IGF1-Rezeptor	IGF-1	>	IGF-2	>>	Insulin
IGF2-Rezeptor	IGF-2				
Insulinrezeptor Isoform-A (IR-A)	Insulin	>	IGF-2	>>	IGF-1
Insulinrezeptor Isoform-B (IR-B)	Insulin	>>>	IGF-2	=	IGF-1
Hybridrezeptor IR-A/IR-B	Insulin	>>	IGF-2	=	IGF-1
Hybridrezeptor IGF-1R/IR-A	IGF-1	=	IGF-2	>>	Insulin
Hybridrezeptor IGF-1R/IR-B	IGF-1	=	IGF-2	>>>	Insulin

Tabelle 1.3. Die Rezeptoren des Insulin/IGF-Systems und die Affinität der Liganden

(Zusammenfassende Darstellung auf der Grundlage von „Insulin, insulin receptors, and cancer“, von Vigerni et al., „Insulin receptor and cancer“ von Belfiore et al., „The IGF system“ von Annunziata et al. und „The insulin receptor: A new target for cancer therapy“ von Malaguarnera und Belfiore ^{49,73,76,96})

IR und IGF-1R zeigen viele Übereinstimmungen, eine differenzierte Wirkung entsteht jedoch durch unterschiedliche Expressionsmuster im Körper.^{69,114} So wird der IR typischerweise in Muskel-, Fett- und Lebergewebe exprimiert, während der IGF-1R in Muskel- und Fettgewebe nur in geringerem Maße vorkommt.¹⁰⁷ Außerdem führt die präferenzielle Aktivierung spezieller intrazellulärer Interaktionen und Kaskaden zu unterschiedlichen Effekten.¹⁰³ Durch Ligandenbindung an den IGF-1R werden besonders über die RAS/ERK-Kaskade mitogene und proliferative Effekte vermittelt.¹⁰⁷ Zusätzlich existieren unterschiedliche Theorien, wonach einige Adapterproteine, wie das Proto-Onkogen „CT10 Regulator of Kinase“ (Crk II) und 14-3-3 Proteine, präferenziell an den IGF-1R binden und onkogene Wirkungen vermitteln.^{76,115,116} Die distinkten Einflüsse in Bezug auf die Auslösung spezifischer mitogener oder metabolischer Signalwege sind bislang nicht abschließend aufgeklärt.⁶⁹

Des Weiteren kann es zur Entstehung gemischter Rezeptoren kommen (Hetero-Tetramer).¹¹⁷ Bei diesen IR-/IGF-1R-Hybriden dimerisiert ein IR-Molekül mit einem Rezeptormolekül des IGF-1-Rezeptors.¹¹⁷ Sind IR und IGF-1R zu ähnlichen Anteilen in einem Gewebe vorhanden, ist die Bildung von diesen Hybridrezeptoren häufig.¹¹⁸ Dabei können beide Isoformen des IR gleichermaßen die Bindung mit dem IGF-1R eingehen.¹¹⁸ Die Affinität von IGF-1 scheint höher

zu dem IR-A/IGF-1R zu sein als zu dem IR-B/IGF-1R.⁵¹ Es besteht wohl eine niedrige Affinität für Insulin bei beiden Hybridrezeptoren.⁵¹

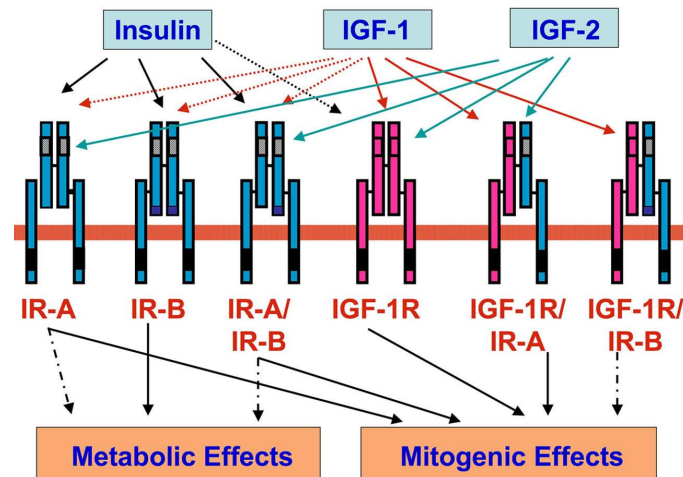


Abbildung 1.7. Die Liganden und Rezeptoren des Insulin/IGF-Systems

(aus „Insulin analogs and cancer“ von Sciacca et al. 2012¹¹⁹)

Die Abbildung zeigt die möglichen Kombinationen der Liganden-Rezeptorbindung innerhalb des Insulin/IGF-Systems. Dabei werden schwächere Affinitäten und Wirkungen mit gestrichelten Pfeilen dargestellt.

Neben IR und IGF-1R wird der Insulin Receptor related Receptor (IRR) als ein dritter Rezeptor der Insulinrezeptorfamilie zugeordnet.¹²⁰ Der IRR hat das gleiche Vorläufergen und weist eine vergleichbare Struktur wie der IR und der IGF-1R auf.^{121,122} Trotz der engen Verwandtschaft mit den anderen Rezeptoren der IR-Familie können die Liganden des Systems, Insulin und IGF-1 und -2, nicht an den IRR binden.¹²¹ Es wird angenommen, dass der IRR eine Rolle bei der pränatalen sexuellen Entwicklung des männlichen Geschlechts spielt sowie darüber hinaus im adulten Körper durch ein alkalisches Milieu aktiviert wird und somit einen Teil der Säure-Basen-Regulation darstellt.^{123,124}

Der IGF-2-Rezeptor besitzt im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren des Insulin/IGF-Systems einen monomeren Aufbau.¹¹⁴ Die Hybridrezeptorbildung ist nicht möglich und seine Funktion unterscheidet ihn von den anderen Rezeptoren des Systems.⁹⁴ Er hat keine Tyrosinkinaseaktivität und entspricht strukturell dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, wodurch er einen Teil des lysosomalen Abbausystems bildet.⁹⁰ Im Insulin/IGF-System stellt er einen spezifischen Rezeptor nur für IGF-2 dar.¹²⁵ Über die Internalisierung und den lysosomalen Abbau von IGF-2 reguliert er dessen Verfügbarkeit in der Blutzirkulation.¹²⁶

1.3.5. Diabetes mellitus Typ 2 und das metabolische Syndrom

Aufgrund der komplexen Wirkung des Insulin/IGF-Systems sind Störungen einzelner Ebenen im Rahmen des Diabetes mellitus Typ 2 mit weitreichenden Folgen verbunden.⁵¹ Infolge der steigenden Erkrankungsrate stellt Diabetes mellitus ein globales gesundheitliches Problem dar.¹²⁷ In Deutschland liegt die Prävalenz von Diabetes mellitus aktuell bei ca. 12%, weltweit sind fast 9% der Erwachsenen betroffen (Stand 2017).¹²⁷ Es handelt sich in 90% der Fälle um Diabetes mellitus Typ 2.¹²⁷ In den letzten Jahren bis Jahrzehnten war ein starker Anstieg der Erkrankungen zu verzeichnen und von einer weiteren Steigerung in den nächsten Jahrzehnten ist auszugehen.¹²⁷ Dabei ist der größte Anteil der Patienten im arbeitsfähigen Alter.¹²⁷ Diabetes mellitus verursacht insgesamt über 10% der Todesfälle weltweit und stellt somit eine der 10 häufigsten Todesursachen dar.¹²⁷ Zudem entstehen hohe Gesundheitskosten sowohl durch Diabetes mellitus selber als auch dessen Folgeerkrankungen.¹²⁷

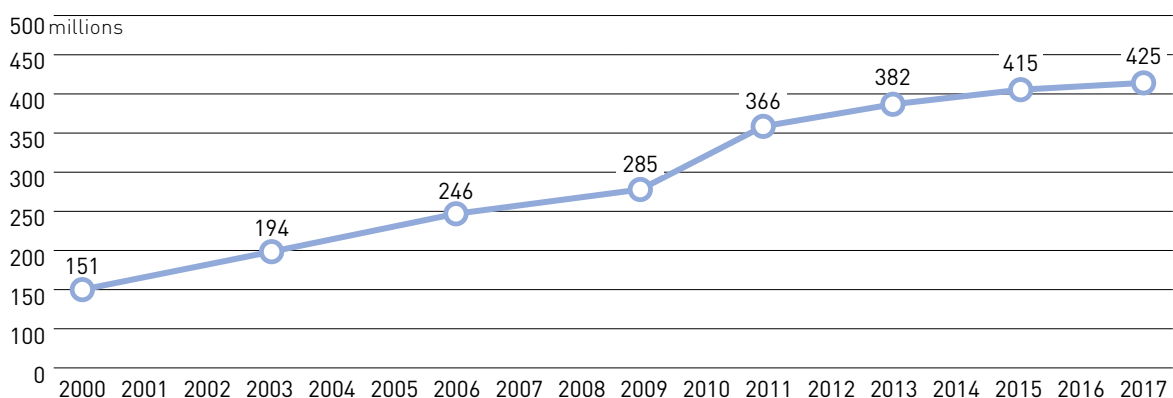


Abbildung 1.8. Die Entwicklung der Prävalenz des Diabetes mellitus weltweit

(aus „IDF Diabetes Atlas; 8th edn. 2017“¹²⁷)

In dem Zeitraum von 2000 bis 2017 war circa eine Verdreifachung der Erkrankungsfälle an Diabetes mellitus zu verzeichnen.

Bei Diabetes mellitus Typ 2 ist eine periphere Insulinresistenz vorhanden, die einem reduzierten zellulären Ansprechen der Zielzellen auf die Stimulation mit Insulin entspricht.^{55,70,127} Es besteht hierdurch ein relativer Insulinmangel.¹²⁷ Erhöhte Blutglucose- und Blutlipidspiegel führen daraufhin zu einer kompensatorischen Insulin-Mehrproduktion der β -Zellen mit Hyperinsulinämie.^{127,128} Langfristig kann es im Laufe der Erkrankung zu einem progredienten Funktionsverlust und einer Apoptose der β -Zellen kommen, sodass zusätzlich ein absoluter Insulinmangel entsteht.^{55,128}

Ein Diabetes mellitus liegt vor bei einer Serumglucose von $\geq 126 \text{ mg/dL}$ in nüchternem Zustand, einem zufälligen Serumglucosewert von $> 200 \text{ mg/dL}$, bei einem Anteil von $\geq 6,5\%$

des glycosylierten Hämoglobin A1c (HbA1c) oder einem pathologischen 2-Stunden-Glucosetoleranztest.¹²⁷

Die Wahrscheinlichkeit, an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken steigt mit zunehmendem Alter.¹²⁷ Das Risiko wird allerdings stark durch die Lebensgewohnheiten der Patienten in Form von Über- und Fehlernährung, Bewegungsmangel und Übergewichtigkeit beeinflusst.¹²⁷ Es besteht eine Assoziation zu weiteren Stoffwechselerkrankungen, die als metabolisches Syndrom zusammengefasst werden.¹²⁹ Neben der Hyperglykämie im Rahmen von Insulinresistenz und Diabetes mellitus sind die Dyslipoproteinämie (Triglyceride, Low-Density-Lipoprotein (LDL) und Cholesterol erhöht, High-Density-Lipoprotein (HDL) erniedrigt), der Bluthochdruck und die Übergewichtigkeit Komponenten des metabolischen Syndroms.¹²⁸

Die Insulinresistenz im Rahmen von Diabetes mellitus Typ 2 entsteht vor allem in dem normalerweise insulinsensiblen Muskel-, Leber- und Fettgewebe durch eine veränderte Signaltransduktion über den IR.¹²⁸ Dabei führen Veränderungen der IR-Expression und IR-Signalkaskaden zu dem reduzierten peripheren Ansprechen auf Insulin.¹²⁸ Es kommt zu einer Verschiebung des IR-A/IR-B-Verhältnisses zugunsten des IR-A.⁵¹ Dies führt dazu, dass verhältnismäßig weniger metabolische Effekte über den IR-B vermittelt werden.⁵¹ Entscheidende Mechanismen sind außerdem die inhibitorische Phosphorylierung von IRS-1, die Herabregulation von GLUT-4 und die Beeinträchtigung der Signalkaskaden über Akt und PI3K.^{70,128,130} Durch die Hyperinsulinämie wird ferner die IGF-1-Synthese gesteigert und die Verfügbarkeit von IGF-1 durch Beeinflussung der IGF-Bindungsproteine erhöht.¹³¹

Insbesondere das Übergewicht stellt einen relevanten Einflussfaktor auf die Entstehung der Insulinresistenz und des Diabetes mellitus Typ 2 im Rahmen des metabolischen Syndroms dar.¹²⁸ Entscheidenden Einfluss darauf hat der Zustand der geringgradigen Entzündung bei Übergewichtigkeit.^{128,132} Hypoxische Adipozyten und freie Fettsäuren lösen vermehrt oxidativen Stress aus und induzieren proinflammatorische Gene.^{128,129,131} Freie Fettsäuren und weitere Abbauprodukte des Fettstoffwechsels wirken lipotoxisch.^{70,128} Die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 fördern die inhibitorische Phosphorylierung von IRS-1 und GLUT-4 und tragen zu der peripheren Insulinresistenz durch die veränderte Signalweiterleitung über Akt und PI3K bei.^{70,128} Die geringgradige Entzündung führt außerdem zu einer Reduktion von Adiponectin, welches physiologischer Weise die Insulinsensibilisierung des Gewebes fördert und bei reduzierter Expression die Insulinresistenz verstärkt.¹²⁸ Einen weiteren Einfluss auf die Insulinresistenz bildet die Glykolysierung von Proteinen bei Hyperglykämie.^{70,131} Die glykolysierten Moleküle wirken glykotoxisch und führen zu einer Mitochondriendysfunktion mit der Bildung von Sauerstoffradikalen und Auslösung einer Entzündung.^{70,128} Dies trägt wiederum zu der Entwicklung einer peripheren

Insulinresistenz durch die Hyperphosphorylierung von wichtigen Signalmolekülen der IR-Signaltransduktion, beispielsweise von IRS-Proteinen bei.⁷⁰

Diabetes mellitus Typ 2 und Hyperglykämie sind mit diversen chronischen Folgeerkrankungen assoziiert.¹²⁷ Hohe Blutzuckerspiegel bedingen die Schädigung der Blutgefäße und kardiovaskuläre Erkrankungen.¹²⁷ Diabetische Nephropathie, Retinopathie und Neuropathie sind charakteristische Folgeerkrankungen und können zu Niereninsuffizienz, Erblindung, und Wundheilungsstörungen sowie Amputationen von Gliedmaßen erforderlich machen.¹²⁷ Damit verbunden sind hohe Kosten für das Gesundheitssystem, etwa durch Nierenersatztherapien oder Versorgung des diabetischen Fußsyndroms.¹²⁷ Auch die Entstehung und Progression von Karzinomerkrankungen wird durch das metabolische Syndrom und Diabetes mellitus Typ 2 gefördert.^{129,131} Um die irreversiblen Folgen eines Diabetes mellitus Typ 2 zu verhindern, ist eine frühzeitige Diagnose und Änderung der Lebensgewohnheiten entscheidend.¹²⁷ In der Stufentherapie des Diabetes mellitus Typ 2 können daneben noch verschiedene antidiabetische Medikamente und zuletzt auch Insulin eingesetzt werden.¹²⁷

1.4. Der Insulinrezeptor als Treiber der Karzinogenese

Die Entstehung von Karzinomen ist ein multifaktorieller Prozess, auf den unterschiedliche Einflussfaktoren wirken.¹ Bei verschiedenen Karzinomerkrankungen steht die Dysregulation des Insulin/IGF-Systems im Zusammenhang mit der Tumorentstehung und -progression.⁵¹ Die aktuelle Studienlage zeigt unter anderem eine erhöhte Expression des IR-A bei Mamma-, Prostata- und Lungenkarzinomen sowie auch bei kolorektalen Karzinomen.⁵¹ Neben der Überexpression des IR-A sind die Expression des IGF-1-Rezeptors auf Tumorzellen und eine gesteigerte Produktion von IGFs durch Tumorzellen bekannt.^{88,90} Veränderungen des Insulin/IGF-Systems im Rahmen von Diabetes mellitus Typ 2 und des metabolischen Syndroms stellen Risikofaktoren für die Karzinomentstehung dar.¹³¹ Adipositas und Störungen des Insulinstoffwechsels beeinflussen die Insulin- und IGF-1-Konzentrationen im Blut und stehen so im Zusammenhang mit einem gesteigerten Karzinomrisiko.^{73,94} Die geringgradige chronische Entzündungsreaktion bei Adipositas trägt in diesem Zusammenhang zu der Entstehung einer peripheren Insulinresistenz bei.¹³⁰ Bei sinkender Insulinsensibilität des Gewebes sind kompensatorisch erhöhte Insulin- und IGF-1-Spiegel die Folge.^{5,94} Hohe IGF-Konzentrationen und hohe Insulinkonzentrationen im Blut sind mit dem erhöhten Risiko und dem schlechterem Outcome von kolorektalen Karzinomerkrankungen verbunden.^{5,133} Die Verschiebung des

Isoformverhältnisses des IR zugunsten der proliferationsfördernden Isoform A ist ein weiterer Bestandteil der peripheren Insulinresistenz.⁵¹ Die Dominanz des IR-A bedingt eine verstärkte Weiterleitung proliferativer Signale über die MAP-Kinase und könnte in diesem Zusammenhang mutmaßlich das Risiko für sCRC erhöhen.^{5,90,94}

Bei Karzinomen kommt es auch bei hohen Insulinkonzentrationen nicht zu der Herabregulation des IR.¹³¹ Im Gegenteil konnte bei sCRC eine vermehrte Expression des IR-A nachgewiesen werden.⁹⁰ Mutationen in Tumorzellen führen zur Herabregulation bestimmter miRNAs, welche normalerweise als Tumorsuppressor fungieren.⁵¹ Diese miRNAs und weitere Transkriptionsfaktoren regulieren die IR-Expression, sodass deren Dysregulation eine IR-Überexpression und Verschiebung des IR-A/IR-B-Verhältnisses zugunsten von IR-A in Tumorzellen ermöglicht.⁵¹ Ein weiterer Faktor bei sCRC ist die Dysregulation der Signaltransduktion des IR aufgrund einer Überexpression von IRS-1 und -2.⁹⁰ Dabei besteht eine Assoziation zu der Tumorprogression sowie zu der Lebermetastasierung.⁹⁰ Die simultane Überexpression von IR-A und IGF-1R auf Karzinomzellen führt darüber hinaus zu einer vermehrten Hybridrezeptorbildung (IR-A/IGF-1R).⁴⁹ Diese Rezeptoren binden die Liganden Insulin, IGF-1 und IGF-2 mit hoher Affinität und lösen präferentiell mitogene und proliferative Signalkaskaden aus.^{49,134}

Zusätzlich kann die Hyperglykämie bei Diabetes mellitus fördernd auf die Progression von malignen Erkrankungen wirken.^{49,132} Eine hohe Zellteilungsrate bedeutet einen hohen Energieverbrauch der Tumorzellen, der durch aerobe Glykolyse gedeckt wird.^{131,135} Durch erhöhte Blutzuckerspiegel steht vermehrt Glukose für die Tumorzellen zur Verfügung.⁴⁹

Bei Karzinomen besteht außerdem eine lokale Überexpression von IGF-2, indem das normalerweise durch Imprinting stumm geschaltete maternale IGF-2-Gen in Tumorzellen aktiviert ist.^{94,136} Genamplifikationen, die Überexpression von Transkriptionsfaktoren und Proteinkonvertasen sowie Mutationen in Tumorsuppressorgenen, wie *TP53*, tragen ebenfalls zu der vermehrten Expression von IGFs in Karzinomen bei.^{51,136} Die auto- und parakrinen Effekte der IGFs auf Zellteilung, -wachstum und -motilität bewirken die Förderung der Karzinomentwicklung und Metastasierung.^{107,136} Dabei werden durch Bindung von IGF-2 an den IR präferentiell die mitogenen Signalkaskaden über MAPK/ERK ausgelöst.⁶⁵ Aufgrund des engen Zusammenhangs und der simultanen Überexpression von IGF-2 und IR-A wird vermutet, dass das eigentliche Ziel von IGF-2 in Tumorzellen nicht der IGF-1R, sondern der IR-A ist.^{73,88}

1.5. Fragestellung

Das Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken wird von multiplen Lebensstilfaktoren beeinflusst.¹⁴ Aktuelle Studienergebnisse bestätigen, dass metabolische Stoffwechselstörungen das Risiko erhöhen, frühzeitig an einem sCRC zu erkranken.¹³⁷ Bei der CU führt die chronische Entzündung zu einem erhöhten cCRC-Risiko über die Dysplasie als Vorstufe.⁴³

Ansichts der generellen Bedeutung des IR für den Zellstoffwechsel, das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung entstand **die Hypothese, dass die Überexpression des IR im Rahmen der Karzinogenese kolorektaler Karzinome relevant ist.** Als Grundlage nahm ich die Veröffentlichungen von Abbruzzese et al. und Bjerrum et al., die eine IR-Überexpression zu frühen Zeitpunkten im Rahmen der Entstehung des sCRC sowie des cCRC zeigten.^{138,139} Um die Hypothese zu prüfen, untersuchte ich die IR-Expression bei Gewebeproben mit CU-assoziierten Dysplasien und sporadischen kolorektalen Adenomen, welche den Vorstufen des cCRC und sCRC entsprechen. Außerdem untersuchte ich die IR-Expression in nicht-dysplastischer Mukosa bei Patienten mit CU verschiedener Schweregrade und die IR-Expression beim cCRC.

Der Vergleich der IR-Expression bei den Karzinomvorstufen ermöglicht Rückschlüsse auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Karzinogenese von sCRC und cCRC. Als potentieller molekularer Marker intestinaler Präkanzerosen könnte sich der IR als diagnostisch und möglicherweise klinisch-therapeutisch bedeutend erweisen.

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign

Um meine Hypothese zu prüfen, wurden sechs Studiengruppen gebildet, die die folgenden Kriterien erfüllten:

Die **erste Gruppe** sollte Gewebeproben von Patienten mit CU-assoziiierter Dysplasie enthalten. Hierbei sollten sowohl low-grade als auch high-grade Dysplasien einbezogen werden. Als Ausschlusskriterien in dieser Gruppe galten entzündliche Darmerkrankungen anderer Genese, wie z.B. Morbus Crohn oder Colitis indeterminata. Die umgebende nicht-dysplastische Mukosa wurde als Gruppe „Dysplasie-Umgebung“ untersucht.

Die **zweite Gruppe** sollte sich aus Gewebeproben von Patienten mit einer Pancolitis ulcerosa zusammensetzen, die als E3 nach der Montreal-Klassifikation eingestuft worden waren. Die Entzündung wies entsprechend bei diesen Patienten die größte Ausdehnung auf, da sie das gesamte Kolon umfasste. Die Voraussetzung zur Aufnahme in die Gruppe war außerdem das Fehlen von dysplastischen Veränderungen.

In der **dritten Gruppe** sollten Gewebeproben von Patienten mit einer linksseitigen CU, entsprechend E2 nach der Montreal-Klassifikation, untersucht werden. Es durften keine dysplastischen Veränderungen in den Biopsien vorhanden sein.

Die **vierte Gruppe** sollte aus Gewebeproben von Patienten mit einem cCRC bestehen. Es sollten sowohl gut differenzierte Adenokarzinome (G1) als auch Adenokarzinome mit einer mäßigen Differenzierung (G2) und gering differenzierte Adenokarzinome (G3) eingeschlossen werden.

In der **fünften Gruppe** sollte Gewebe von tubulären kolorektalen Adenomen untersucht. Lediglich low-grade Adenome sollten ausgewählt werden. Der Ausschluss von CU oder einer anderen entzündlichen Darmerkrankung oder einem entzündlichen Infiltrat der Mukosa sollte gewährleistet sein. Das umgebende, gesunde Darmgewebe wurde als Gruppe „Adenom-Umgebung“ gesondert ausgewertet.

Die **Kontrollgruppe** (sechste Gruppe) sollte Gewebeproben von darmgesunden Patienten beinhalten. Die Mukosa musste histopathologisch als gesund klassifiziert sein. Ausgeschlossen wurden Gewebeproben von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Divertikulose oder Divertikulitis und gastrointestinalen Karzinomen. Des Weiteren durfte die Darmschleimhaut histopathologisch keine Zeichen entzündlicher Veränderungen jeglicher Art zeigen. Patienten mit mikroskopischer Colitis, pseudomembranöser Colitis und Cytomegalie Virus-Colitis wurden ausgeschlossen.

2.2. Gewebeschnitte

Die Zusammenstellung des Kollektivs erfolgte zunächst in theoretischer Vorauswahl unter Beachtung der oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien. Das mit Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete (FFPE)-Gewebematerial stammte aus dem Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UKSH) Kiel. Es handelte sich um Biopsien aus Koloskopien und Resektate von Kolektomien oder Teilkolektomien. Die Proben waren zur Beurteilung von den verschiedenen Fachabteilungen des UKSH sowie von externen Kliniken und niedergelassenen Medizinerinnen eingesandt worden. Das Gewebe wurde zu dem jeweiligen Zeitpunkt der Einsendung zur histologischen Bewertung und Aufbewahrung mit 10%-iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Anschließend wurden die fixierten Proben in Paraffinblöcke gebettet. Von jedem Paraffinblock wurde mit dem Mikrotom Leica Rm2245 drei bis sieben Schnitte von 2µm Dicke hergestellt. Diese wurden auf Superfrost PLUS Objektträger aufgezogen und zunächst über Nacht im Wärmekasten (Binder) bei 54°C getrocknet. Die anschließende Aufbewahrung der Schnitte erfolgte bei -8°C.

2.3. Immunhistochemische Färbung

Um den IR in dem Epithel der Kolonschleimhaut nachzuweisen wurde eine immunhistochemische Antikörperfärbung (IHC) angewandt. Diese wurde als manuelle Färbung über zwei Tage durchgeführt.

2.3.1. Materialien

Substanz	Lot/Ref-Nummer	Hersteller	Anwendung	
			Tag 1	Tag 2
Xylol		Bezug durch Th. Geyer	Absteigende Alkoholreihe	Aufsteigende Alkoholreihe
96% (99%) Ethanol	8419.1 (Bestell-Nummer)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Absteigende Alkoholreihe	Aufsteigende Alkoholreihe
Deionisiertes Wasser	8420.1 (Bestell-Nummer)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Absteigende Alkoholreihe	Aufsteigende Alkoholreihe
UltraVision Hydrogen Peroxide Block TA-125-H2O2Q	02Q150904	Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA	Blockierung	
UltraVision Protein Block TA-125-PBQ	PBQ160223	Thermo Fisher Scientific, Fremont, USA	Blockierung	

Antibodydiluent 1: grün	REF: ZUC025-500 LOT: P882	Zytomed Systems GmbH, Berlin	Antikörper-verdünnung	
Antibodydiluent 2: klar	REF: AR9352 LOT: SLBT3060	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch	Antikörper-verdünnung	
Bond Primary Antibody Diluent				
ab 36550 monoclonal Maus Insulin-Rezeptor a	LOT: GR221398-6	Abcam, Cambridge, UK	Etablierung	Primäranti-körper
ab137747 polyclonal Rabbit Insulin Rezeptor	LOT: Gr246269-5	Abcam, Cambridge, UK	Etablierung	
Rabbit Polyclonal Antibody to INSR/CD220	LOT: HB04SE3006	Sino biological Inc., Peking, China	Etablierung	
INSRβ(4B8) rabbit mAb	LOT: 8	Cell Signalling Technologies, Danvers, USA	Färbung des Kollektivs	
ImmPRESS REAGENT PEROXIDASE Universal Anti-MOUSE/RABBIT Ig – MP-7500	ZB 0821 ZC 0307	Vector Laboratories, Inc, Burlingame, USA		Sekundäranti-körper
ImmPact NovaRed Peroxidase Substrate SK-4805 Kit		Vector Laboratories, Inc, Burlingame, USA		Chromogen
Hämalaunlösung sauer nach Mayer (Hämalaun-RL) 0088663	4914 I	Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig		Kernfärbung
pertex 41-4011 00	10518	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf		Eindeckelung
Leitungswasser			Spülung	Spülung

Tabelle 2.1. Chemikalien und Substanzen

Puffer	Inhalt	LOT/Ref-Nummer	Hersteller	Anwendung
10x TBS (Tris-buffered saline)	87,57g Natriumchlorid	3957.2 (Artikelnummer)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Spülung mit 1x TBS
	60,57g Tris-Base (Trizma Base)	LOT: SLBQ0403V	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Spülung mit 1x TBS
	1000ml deionisiertes Wasser		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Spülung mit 1x TBS
	Titration mit HCL auf pH 7,4			Spülung mit 1x TBS
Tris-EDTA-Puffer 10x	1,21g Tris-Base (Trizma Base)		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Pascal-Druckkochtopf
	0,37g EDTA (Tris EDTA Buffer Solution)	LOT: 1298629	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	Pascal-Druckkochtopf
	1000ml deionisiertes Wasser		Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Pascal-Druckkochtopf
pH: 9,0 Citrat-Puffer 10x	3,78g Zitronensäure			Pascal-Druckkochtopf Etablierung
	24,21g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Charge: 191168925	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Pascal -Druckkochtopf Etablierung
pH: 6,0	1000ml Zweifachdestilliertes Wasser (Bidest)	Art-Nr. 3478.1 Charge: 212186423	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	Pascal-Druckkochtopf Etablierung

Tabelle 2.2. Pufferansätze

Material	Produkt(-Nummer)	Hersteller	Anwendung
Superfrost PLUS Objektträger	J1800AMNZ	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	Eindeckelung
Deckgläser (Menzel-Gläser) 24x60mm		Menzel, Braunschweig	Eindeckelung
Mikrotom	RM2245	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch	Schnitt
Kühlplatte	COP 30	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf	Schnitt (-14°C)
Brutschrank	9010-0002	Binder, Tuttlingen	Schnitt, Trocknung bei 50-55°C
	B 28 #04-68149		
Pascal	S2800	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	Druckkochtopf
See-Saw-Rocker	SSL4	Stuart/Cole Parmer, Vernon Hills, USA	Spülung
Mini Centrifuge	GMC-060 (Seriennummer: 0307058)	Neo Lab, Heidelberg	Zentrifuge
Lab Dancer Vario Färbeautomat	01.735279	IKA, Staufen	Vortex-Schüttler
	Leica BOND-MAX	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar	
Mikroskop	Leica DM1000	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar	Auswertung
Scanner	Leica SCN 400	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar	Scan
Computerprogramme	Leica SCN400 Client	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar	Scan
	Leica SCN400 Image Viewer	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar	Scan, Bildherstellung
	XnView	Pierre-Emmanuel Gougelet, Reims, Frankreich	Bildherstellung
Statistikprogramm	SPSS Version 24	IBM, Armonk, USA	Statistische Auswertung

Tabelle 2.3. Weitere Materialien, Geräte und Programme

2.3.2. Durchführung

Zu Beginn der Behandlung wurden die Objektträger mit dem FFPE-Gewebe entparaffiniert um das Epitop für die Färbung zugänglich zu machen. Es folgte die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe. Dafür wurden die Objektträger zunächst zweimal für jeweils 15 Minuten in reinem Xylol entparaffiniert. Es folgten zwei fünf minütige Spülschritte in 99%-igem Ethanol, zweimal fünf Minuten in 70%-iger Ethanollösung, zweimal zwei Minuten in 50%-iger Ethanollösung und abschließend die zweifache Spülung in deionisiertem Wasser.

Nach Vollendung der absteigenden Alkoholreihe wurden die entparaffinierten Objektträger mit 1x Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Puffer behandelt. Die Pufferlösung und die Hitzebehandlung im nächsten Schritt bewirkten die Lockerung der Quervernetzung der Proteine des Gewebes. Die Fixierung mit Formalin wurde dadurch rückgängig gemacht. Der

Druckkochtopf Pascal der Firma DakoCytomation wurde mit 500 ml deionisiertem Wasser gefüllt und die Küvette mit den Objektträgern (in EDTA-Puffer) mittig in dem Behälter platziert. Durch Voreinstellung des Programms wurde die Temperatur automatisch über 15 Minuten auf 125°C gesteigert und dann eine Minute gehalten. Anschließend reduzierte das Gerät die Temperatur innerhalb von 20 Minuten auf die eingestellte Abkühltemperatur von 10°C. Nach Vollendung des Programmes wurde die Küvette entnommen und die Objektträger insgesamt neun Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Dabei wurde die Wassertemperatur schrittweise alle drei Minuten gesenkt. Die ersten drei Minuten wurde heißes Wasser verwendet, anschließend drei Minuten lauwarmes Wasser und zum Schluss erfolgten drei Minuten Kühlung mit kaltem Wasser.

Das Leitungswasser in der Küvette wurde durch 1x „Tris-buffered Saline“ (TBS) ersetzt und die Objektträger für fünf Minuten auf dem see-saw rocker SSL4 der Firma Stuard mit einer Frequenz von 37/Minute gespült.

Es folgte die Blockierung mit Hydrogen Peroxidase Block (Thermo Fisher Scientific) um die Aktivität der endogenen Peroxidase in dem Gewebe zu hemmen. Dadurch sollten falsch-positive Signale bei der Färbung verhindert und die Hintergrundfärbung reduziert werden. Zu diesem Zweck wurden die Schnitte aus der TBS Lösung entnommen und die Objektträger mit „Hydrogen Peroxidase Block“ (Thermo Fisher Scientific) bedeckt. Die Inkubation erfolgte für 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Anschließend folgte die erneute dreimalige Spülung der Objektträger in 1x TBS für jeweils fünf Minuten auf dem See-Saw Rocker SSL4. Zwischen den Spülgängen wurde die TBS Lösung jeweils erneuert.

Die Objektträger wurden erneut aus der Küvette entnommen und das Gewebe wurde mit „UltraVision Protein Block“ (Thermo Fisher Scientific) behandelt, um die Spezifität der Antikörperbindung im weiteren Verlauf zu steigern. Die unspezifische Bindung des Antikörpers an Proteinkomplexe sollte so reduziert werden. Die Inkubationszeit betrug fünf Minuten bei Raumtemperatur.

Im Anschluss folgten drei Spülgänge in 1x TBS für jeweils zwei Minuten, wobei die TBS Lösung zwischen den Spülgängen jeweils erneuert wurde.

Der Primärantikörper wurde bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde die Antikörperverdünnung mit dem Antibodydiluenten (ABD) hergestellt. Es wurde eine

Verdünnung von 1:50 hergestellt. Auf jeden Objektträger wurden 200µl der Antikörperverschüttung pipettiert. Dabei war darauf zu achten, dass das Gewebe vollständig und gleichmäßig bedeckt war. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte die Inkubation bei 4-8°C für 12 Stunden.

Für den zweiten Teil der Färbung wurde das Gewebe zunächst in drei Spülgängen in 1x TBS jeweils fünf Minuten gespült. Die Schnitte wurden anschließend mit dem Sekundärantikörper „ImmPRESS REAGENT Peroxidase Universal Anti-Mouse/Rabbit Ig MP-7500“ (Vectorlabs) bedeckt. Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Es folgten drei weitere Spülgänge in 1x TBS für jeweils fünf Minuten.

Die Herstellung des Chromogens erfolgte durch Ansetzen des „ImmPACT NovaRed Peroxidase Substrate Kits“ (Vector SK-4805). Hierfür wurden nach Anleitung des Herstellers zu 5ml „ImmPACT NovaRED Diluent“ nacheinander drei Tropfen der Reagenz 1 und jeweils zwei Tropfen der Reagenz 2, 3 und 4 hinzugefügt. Zwischen den einzelnen Schritten sowie vor Anwendung, wurde die Lösung jedes Mal mit einer Pipette sorgfältig gemischt. Auf jeden Objektträger wurde 200µl des Substrates aufpipettiert. Die Inkubationszeit bei Raumtemperatur betrug sieben Minuten. Es folgten drei Spülungen in deionisiertem Wasser.

Im Zuge der Gegenfärbung wurden die Gewebeschnitte für eine Minute in Hämalanlösung sauer nach Mayer (Dr. K. Hollborn & Söhne) gebadet und anschließend zehn Minuten unter fließendem warmen Leitungswasser gebläut. Das enthaltende Hämatoxylin färbte die Zellkerne blau. Dies diente der besseren Beurteilbarkeit bei der mikroskopischen Auswertung, denn die blauen Zellkerne stellen einen Kontrast zu der rötlichen immunhistochemischen Färbung dar. Das Bläuen mit Leitungswasser war notwendig, da nach der Einwirkung des Farbstoffs im sauren Milieu ein pH-Wert von 7 eingestellt werden muss, um die Färbung zu konservieren.

Abschließend erfolgte die erneute Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe. Nach zweimaligem Spülen mit deionisiertem Wasser, verbrachte das Gewebe zweimal drei Minuten in 70%-iger Ethanol-Lösung und jeweils zweimal fünf Minuten in 99%-igem Ethanol und reinem Xylol.

Die Gewebeschnitte wurden unter Verwendung von Pertex Schnelleindeckmedium (MEDITE GmbH) mit Deckgläsern der Firma Menzel-Gläser eingedeckelt.

2.4. Antikörperetablierung und Antikörper

Ursprünglich sollte für den Nachweis des IR in unserer Studie der Antikörper insulin receptor alpha (INSRA, I7661-25E, dilution 1:50; US Biological, Salem, MA) genutzt werden. Dieser wurde von Bjerrum et al. in der Arbeit „Transcriptional Analysis of Left-sided Colitis, Pancolitis, and Ulcerative Colitis-associated Dysplasia“ verwendet.¹³⁹ Allerdings stand der Antikörper nicht mehr zur Verfügung, da der Bestand komplett aufgebraucht war. Es musste somit ein anderer Antikörper zum Nachweis des IR verwendet werden.

IR als Zielstruktur getestet. Für den ersten Schritt jeder Etablierung der verschiedenen Antikörper wurde stets das gleiche Gewebe verwendet. Es handelte sich um ein „Tissue Microarray“ (TMA) von kolorektalen Karzinomen, Gewebeproben eines Kolonresektats und eines Pankreasresektats. Stellte sich der Antikörper als potentiell einsetzbar heraus, wurden weitere Etablierungsfärbungen an einem kleinen Validierungskollektiv durchgeführt. Dieses bestand aus zwei Gewebeproben aus jeder Versuchsgruppe und drei zusätzlichen TMAs von kolorektalen Karzinomen.

Der monoklonale Antikörper „ab36550 Maus Insulin-Rezeptor α “ (abcam) sollte laut Hersteller an der extrazellulären Domäne, speziell den Cystein-reichen Abschnitt (AS 140-301), binden. Zur Testung und Etablierung des Antikörpers wurden mehrere manuelle Färbungen sowie Automatenfärbungen mittels Leica Bond-Max durchgeführt. Um das Ergebnis zu optimieren wurde eine Reihe an Färbungen mit den Verdünnungen 1:500, 1:200, 1:100 und 1:50 durchgeführt (Herstellerempfehlung: 1 μ g/ml) und dabei sowohl mit Citrat-Puffer als auch mit EDTA-Puffer gearbeitet. Der Antikörper zeigte allerdings eine schwache Färbung, sodass sich nur die Konzentration von 1:50 als potentiell verwendbar herausstellte. Darüber hinaus zeigte sich bei den Färbungen eine starke Kernfärbung ohne membranständige Färbung. Der Antikörper wurde für diese Studie verworfen, da er nicht den membranständigen IR nachweist.

Der polyklonale Antikörper „ab137747 Rabbit Insulin Rezeptor“ (abcam) wurde ebenfalls getestet. Seine Zielstruktur liegt auf dem Abschnitt AS 939-1047. Auf Herstellerempfehlung wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1:1000, 1:500, 1:200 und 1:100 gefärbt. Aufgrund der intensiven Färbung erwies sich eine geringe Konzentration als angemessen. Es wurden weitere IHC-Durchgänge mit einer Verdünnung von 1:2000 durchgeführt. Eine Optimierung sollte ferner durch die Variation des Puffers (Citrat oder EDTA) und des ABD erreicht werden. Jedoch war bei sämtlichen Verdünnungen eine starke Hintergrundfärbung, besonders von Myozyten und Lymphozyten, zu beobachten. Mit

abnehmender Konzentration des Antikörpers bis auf 1:4000 konnte diese Hintergrundfärbung im Verhältnis zu der Zielfärbung nicht reduziert werden. Da dabei aber eine Abnahme der membranständigen Färbung zu beobachten war, wurde der Antikörper „ab137747 Rabbit Insulin Rezeptor“ als zu unspezifisch eingestuft. In dieser Studie fand er keine Verwendung.

Es wurde außerdem der Antikörper „Rabbit Polyclonal Antibody to INSR/CD220“ der Firma Sino biological Inc. zum Nachweis des IR getestet. Das genaue Epitop des Antikörpers wurde vom Hersteller nicht spezifiziert. Für die IHC wurde eine Konzentration von 1-3 µg/mL empfohlen. Für die Etablierung wurde zunächst eine Verdünnungsreihe (1:200, 1:400, 1:800, 1:1200) genutzt. Bei weiteren Färbungen wurde die Verdünnung bis 1:2000 erhöht sowie Citrat und EDTA als Puffer getestet. Der Antikörper zeigte eine klare und spezifische IR-Färbung in dem Gewebe.

Der Antikörper „INSR β (4B8) rabbit mAb“ der Firma Cell Signalling Technologies, dessen Zielstruktur auf der β -Untereinheit des IR liegt, wurde getestet. Dieser monoklonale Antikörper wurde zuvor noch nicht für eine immunhistochemische Färbung verwendet, sodass keine Orientierungsangaben oder Erfahrungswerte für die Verdünnung durch den Hersteller angegeben waren. In einem ersten Etablierungsdurchgang wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 und 1:800 angewandt. Es zeigte sich bei der Auswertung dieser Färbung, dass der Antikörper aufgrund der eher geringen Färbung in hoher Konzentration verwendet werden muss. In weiteren Schritten der Etablierung wurden die Faktoren Verdünnung, Puffer, ABD und Inkubationszeit des Chromogens variiert, um die beste Färbung zu erhalten. Die Konzentration von 1:50 unter Verwendung des ABD der Firma Zytomed Systems und des EDTA-Puffers sowie eine Inkubationszeit des NovaReds von 7 Minuten erwies sich als optimal.

Letztendlich kamen für die immunhistochemische Färbung der Studie nur der „Rabbit Polyclonal Antibody to INSR/CD220“ der Firma Sino biological Inc und der cell signalling Antikörper „INSR β (4B8)“ in Frage. Beide zeigten in den Testfärbungen des Validierungskollektivs ein ähnliches Verteilungsmuster. Die Entscheidung fiel aber letztendlich auf den „INSR β (4B8)“ Antikörper, da dieser die deutlichste Färbung der Zielstruktur mit wenig ausgeprägter Hintergrundfärbung zeigte. Hierdurch kann von einer höheren Spezifität ausgegangen werden. Dieser Antikörper war von dem Hersteller bisher nur für Western blots und Immunpräzipitation vorgesehen. Mit der hier durchgeführten Etablierung ließ sich allerdings zeigen, dass dieser monoklonale Antikörper für immunhistochemische Färbungen verwendet werden kann.

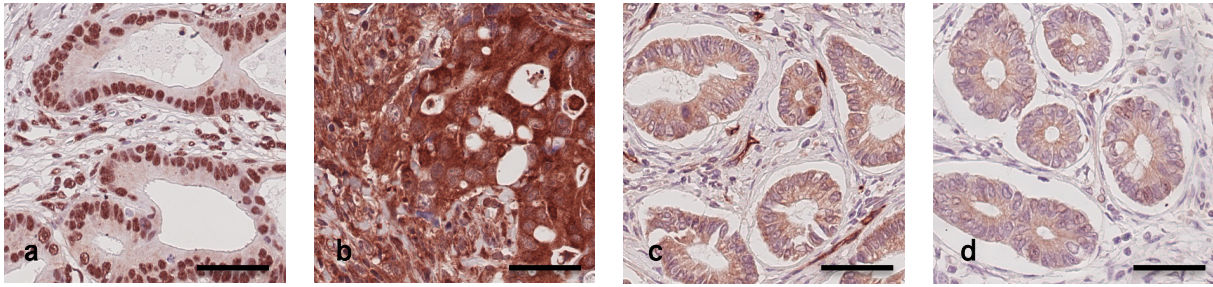


Abbildung 2.1. Die immunhistochemischen Färbungen zur Etablierung im Vergleich

a: ab36550 Maus Insulin-Rezeptor α (abcam), b: ab137747 Rabbit Insulin Rezeptor (abcam), c: INSR/CD220 (Sino biological Inc.), d: INSR β (4B8) (Cell Signalling). Für die immunhistochemischen Färbungen dieser Studie wurde nach den Etablierungsfärbungen der Antikörper INSR β (4B8) der Firma Cell Signalling ausgewählt. Anti-Insulinrezeptor-Antikörper, Hämatoxylin-Gegenfärbung; Originalvergrößerung a-d: 200x, Maßstab: 1 cm = 50 μ m.

2.5. Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung der immunhistochemischen Färbung wurde mit dem Mikroskop Leica DM1000 durchgeführt. Die Bewertung jedes Gewebeschnitts erfolgte anhand zuvor definierter Kriterien.

Für die Auswertung wurde zwischen membranständiger und zytoplasmatischer Färbung unterschieden. Die Bewertung der membranären und zytoplasmatischen Färbungen innerhalb des Gewebes erfolgte getrennt voneinander. Die Intensität der immunhistochemischen Färbung in dem Gewebe wurde jeweils in die Stufen 0, +1, +2 und +3 gegliedert.

Sieben festgelegte Referenzschnitte gewährleisteten eine vergleichbare, nachvollziehbare und konstante Bewertung aller gefärbten Proben. Die Auswahl der Referenzen erfolgte unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit der Gewebeprobe. Zunächst wurde das gesamte Kollektiv im Schnelldurchlauf mikroskopisch begutachtet, um einen Überblick und eine erste Einschätzung der Färbungsverhältnisse zu erhalten. Daraufhin wurden die Referenzschnitte ausgewählt. Für die Intensitätsstufe 0 wurde eine Probe gewählt, bei der weder eine zytoplasmatische, noch eine membranständige Färbung vorlag. Für die Referenzschnitte der membranären Färbung wurden drei Gewebeproben ausgewählt: Es wurde ein Schnitt mit schwacher Membranfärbung als Intensität +1 festgelegt und ein Schnitt mit starker membranständiger Färbung als Intensität +3. Eine Gewebeprobe mit mäßiger membranärer Anfärbung repräsentierte die Intensität +2. Analog hierzu wurden drei Gewebeproben mit zytoplasmatischer Färbung als Referenz festgelegt, ebenfalls ein Referenzschnitt zu jeder Intensitätsstufe.

Durch die Anwendung des Histocores (HScore) konnte eine verbesserte Gegenüberstellung der Ergebnisse erreicht werden. Für jede Probe wurde nicht ein Intensitätswert bestimmt, sondern es wurden die prozentualen Anteile jeder Intensitätsstufe in dem Gewebe festgelegt. Anschließend wurde der Intensitätswert jeder Stufe (entsprechend 0, 1, 2 und 3) mit der zugehörigen Prozentzahl multipliziert. Die Addition der Produkte ergab den HScore-Wert. Dieser konnte entsprechend Werte zwischen minimal 0 bis maximal 300 annehmen. Die Bewertung wurde für die membranständige und die zytoplasmatische Färbung getrennt voneinander durchgeführt. Infolgedessen ergaben sich für jede Gewebeprobe zwei HScore-Werte, einen HScore für die membranständige Färbung und einen HScore für die zytoplasmatische Färbung.

Histocore (HScore) - Formel = $[0 \times (\% \text{-Anteil } 0)] + [1 \times (\% \text{-Anteil Intensitätsstufe } 1)] + [2 \times (\% \text{-Anteil Intensitätsstufe } 2)] + [3 \times (\% \text{-Anteil Intensitätsstufe } 3)]$

Des Weiteren wurden bei der Auswertung jeder Gewebeprobe Auffälligkeiten in Bezug auf das Verteilungsmuster der Färbung in dem Gesamtgewebe sowie die Lokalisation der Färbung auf zellulärer Ebene notiert.

Für diese Arbeit wurden die Objektträger mit dem Scanner Leica SCN400 und mittels des Computerprogramms Leica SCN400 Client eingescannt. Mit dem Programm Leica SCN400 Image Viewer wurden aus den gescannten Dateien die Bildausschnitte für diese Dissertation erstellt. Die Farbverhältnisse wurden nicht verändert.

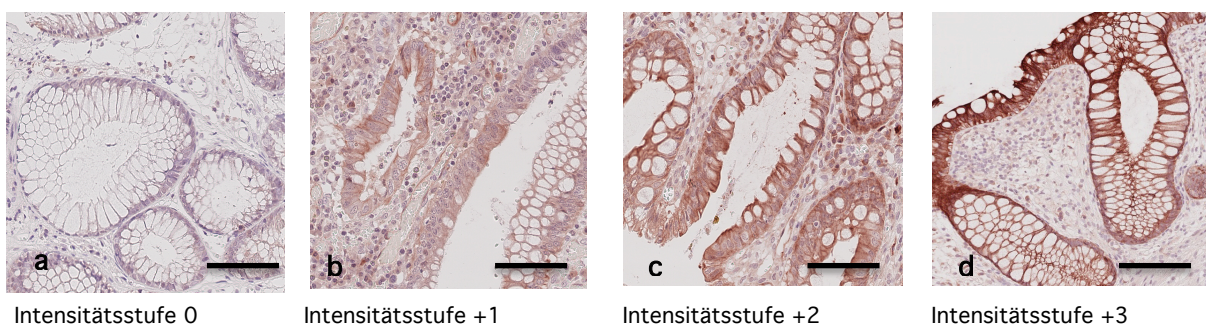


Abbildung 2.2. Die Referenzen für die Beurteilung der membranständigen Färbung

Anti-Insulinrezeptor-Antikörper, Hämatoxylin-Gegenfärbung; Originalvergrößerung a-d: 200x, Maßstab: 1 cm = 50µm.

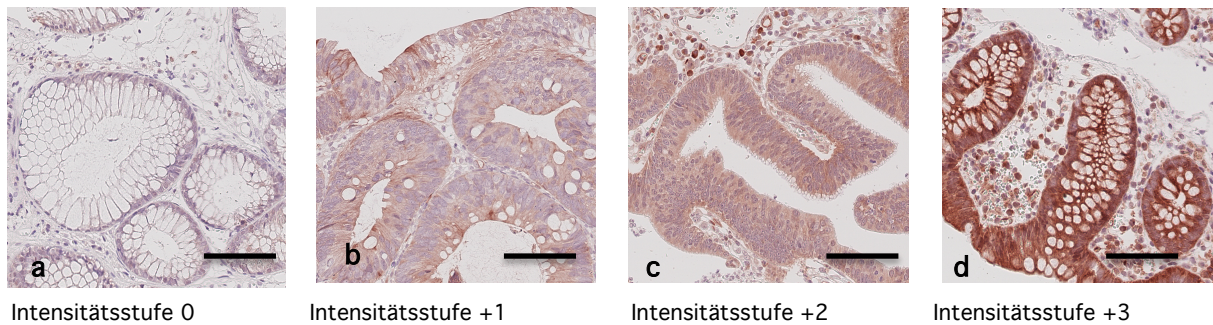


Abbildung 2.3. Die Referenzen für die Beurteilung der zytoplasmatischen Färbung

Anti-Insulinrezeptor-Antikörper, Hämatoxylin-Gegenfärbung; Originalvergrößerung a-d: 200x, Maßstab: 1 cm = 50μm.

2.6. Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung wurden die Beobachtungen innerhalb des gesamten Patientenkollektivs sowie Unterschiede und Gemeinsamkeiten im Gruppenvergleich analysiert. Darüber hinaus wurde der Zusammenhang zwischen zytoplasmatischer und membranständiger Färbung innerhalb des Gesamtkollektivs und bei den einzelnen Gruppen untersucht.

Die Berechnung der Korrelation zwischen der membranständigen und zytoplasmatischen Färbung erfolgte mit dem Korrelationskoeffizienten nach Kendalls-tau mit einem Signifikanzniveau (α) = 0,01. Für die Errechnung des Zusammenhangs der membranständigen und zytoplasmatischen Färbung wurde außerdem der Pearson Chi-Quadrat-Test verwendet. Signifikante Unterschiede zweier Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-Test bestimmt. Dabei erfolgte jeweils die Testung von zwei Gruppen im direkten Vergleich. Es wurde stets zwischen membranständiger und zytoplasmatischer Färbung unterschieden. Das Signifikanzniveau wurde mit α = 0,05 festgelegt. Für die Auswertung wurde das Programm SPSS Version 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Zusammensetzung des Patientenkollektivs

Das Gesamtkollektiv der Studie beinhaltete 91 Gewebeproben von 70 Patienten. Durch die getrennte Auswertung des dysplastischen und nicht-dysplastischen Gewebes bei den CU-assoziierten Dysplasien und sporadischen kolorektalen Adenomen ergab sich für das Kollektiv eine Gesamtzahl von 134 Fällen. Von diesen 134 Fällen waren 77,6% männlich (104) und 22,4% weiblich (30). Das Alter der Patienten betrug im Median 54 Jahre, wobei der älteste in der Studie eingeschlossene Patientin 92 Jahre war und der jüngste 21.

Gruppe	Anzahl (absolut)	Weiblich (absolut)	Männlich (absolut)	Medianes Alter in Jahren
Dysplasie	26	2	24	51
Dysplasie-Umgebung	24	2	22	51
Pancolitis ulcerosa (Montreal-Klassifikation E3)	10	3	7	44
Colitis ulcerosa (Montreal-Klassifikation E2)	16	3	13	44
Colitis ulcerosa- assoziiertes Karzinom	9	4	5	54
Adenom	20	5	15	70
Adenom-Umgebung	19	5	14	69
Kontrollgruppe	10	6	4	65
Insgesamt	134	30	104	54

Tabelle 3.1. Patientenkollektiv

Die Tabelle stellt eine Übersicht über die Geschlechter- und Altersverteilungen in den Gruppen dar.

In der Gruppe „Dysplasie“ wurden 26 Gewebeproben ausgewertet. Im Sinne der früheren Klassifikation umfassten zwei der Proben DALM. Eine low-grade Dysplasie war bei zwölf Proben vorhanden, sieben Proben enthielten eine high-grade Dysplasie, wobei die Dysplasie in drei dieser Gewebeproben nur fokal bis high-grade klassifiziert wurde. Bei sieben Gewebeproben konnten keine genauen Angaben bezüglich des Differenzierungsgrads der Dysplasie gemacht werden. Bis auf zwei Dysplasiefälle enthielten alle Gewebeproben ebenfalls nicht-dysplastische Mukosa. Daraus ergab sich die Gruppe „Dysplasie-Umgebung“ mit 24 Fällen.

Gewebeproben von Patienten mit CU ohne Dysplasie wurden anhand der Ausdehnung der CU entsprechend der Montreal Klassifikation in die Gruppen „Pankolitis“ und „Linksseitenkolitis“

eingeteilt. Es wurden zehn Proben mit Pancolitis ulcerosa untersucht. Bei diesen Proben betraf die Ausbreitung der Entzündung das ganze Kolon, E3 der Montreal Klassifikation entsprechend. Bei acht Gewebeproben war eine hochgradige Entzündungsaktivität vorhanden, bei zwei Gewebeproben war die Entzündung mittelgradig ausgeprägt.

Es wurden 16 Gewebeproben mit Linksseitencolitis, E2 der Montreal-Klassifikation entsprechend, untersucht. Histologisch zeigte sich bei sieben dieser Gewebeproben eine geringgradige Entzündungsaktivität, bei einer Gewebeprobe eine mittelgradige und bei acht Gewebeproben eine hochgradige Entzündungsaktivität.

Es wurden neun cCRC in der Gruppe „Karzinom“ untersucht. Eingeschlossen wurden acht tubulo-villöse Adenokarzinome und ein muzinöses Adenokarzinom. Dabei handelte es sich um zwei gut differenzierte Adenokarzinome (G1), fünf Adenokarzinome mit einer mäßigen Differenzierung (G2) und zwei gering differenzierte Adenokarzinome (G3).

Die Gruppe „low-grade Adenome“ umfasste 20 Gewebeproben. Bis auf eine Gewebeprobe war in allen Proben ebenfalls nicht-adenomatöse Mukosa vorhanden. Dieses Gewebe wurde als Gruppe „Adenom-Umgebung“ zusammengefasst und bestand entsprechend aus 19 Fällen.

Als Kontrollgruppe wurden zehn Fälle mit gesunder Darmschleimhaut ausgewertet.

3.2. Allgemeine Beobachtungen

Anhand der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper „INSR β 4B8“ (Cell Signalling) konnte ich den IR in den verschiedenen Gewebeproben nachweisen. Bei der histologischen Auswertung wurden Merkmale festgestellt, die charakteristisch für die Gewebeproben des gesamten Kollektivs waren und im Folgenden beschrieben werden.

3.2.1. Heterogenität

Eine Beobachtung stellte die Heterogenität des Färbemusters innerhalb des Epithels einer Gewebeprobe dar. Bei 79,9% (zytoplasmatisch) bzw. 82,7% (membranständig) der Proben waren Bereiche mit unterschiedlich stark ausgeprägter IR-Expression nachzuweisen. Der Anteil der Gewebeproben des gesamten Kollektivs, bei denen mindestens drei Intensitätsstufen der

immunhistochemischen Färbung gleichzeitig vorhanden waren lag bei 26,8% zytoplasmatisch und 63,3% membranär. Bei der Membranfärbung enthielten 29,1% der Proben alle Intensitätsstufen. Ferner fielen gruppenübergreifend einzelne Epithelzellen oder Zellgruppen auf, die sich durch eine starke membranständige IR-Expression von dem restlichen Gewebe deutlich abgrenzten. Am Häufigsten war diese Beobachtung bei der Dysplasie-Gruppe und bei der Karzinom-Gruppe vorhanden. Bei 50% der dysplastischen Gewebeproben und 55,6% der Adenokarzinome bestand eine ausgeprägte Heterogenität der IR-Expression. Infolge einer fokal gesteigerten IR-Expression waren die betroffenen Zellverbände deutlich gegenüber ihrer Umgebung abgrenzbar. Nur bei der Kontrollgruppe war diese Beobachtung nicht vorhanden.

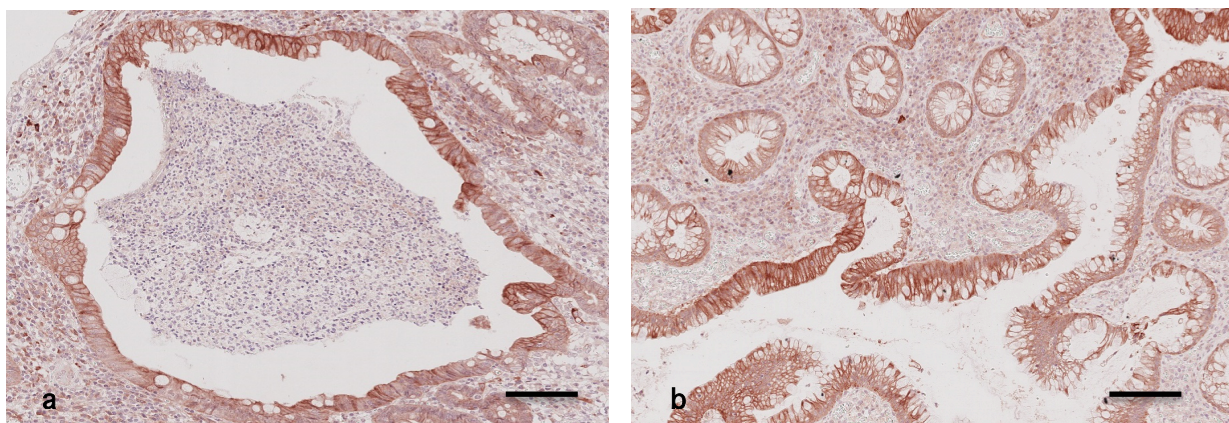


Abbildung 3.1. Die Heterogenität der Insulinrezeptorexpression innerhalb einer Gewebeprobe

a: Linksseitenkolitis, b: Pancolitis. Exemplarische Darstellung der heterogenen IR-Expression bei Gewebe unterschiedlicher Gruppen des Kollektivs. Hier jeweils Epithelabschnitte mit stärkerer Insulinrezeptorexpression als die umgebenden Epithelzellen. Anti-Insulinrezeptor-Antikörper, Hämatoxylin-Gegenfärbung; Originalvergrößerung a-b: 100x, Maßstab: 1 cm = 100µm.

Gruppe	Gesamtanzahl	Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit in %
Adenom	20	4	20,0
Adenom-Umgebung	19	2	10,5
Dysplasie	26	13	50,0
Dysplasie-Umgebung	24	6	25,0
Karzinom	9	5	55,6
Pancolitis ulcerosa	10	1	10,0
Linksseitencolitis ulcerosa	16	6	37,5
Kontrollgruppe	10	0	0,0
Insgesamt	134	37	27,0

Tabelle 3.2. Heterogenität der Insulinrezeptor-Expression innerhalb einer Patientenprobe – Häufigkeiten im Gruppenvergleich

3.2.2. Zytoplasmatische und membranständige Insulinrezeptorexpression

Der IR war sowohl in der Plasmamembran sowie auch im Zytoplasma von Enterozyten nachweisbar. Grundsätzlich war die zytoplasmatische Färbung vergleichsweise stärker ausgeprägt als die Membranfärbung. Für das Gesamtkollektiv lag der Median der zytoplasmatischen Färbung bei HScore = 145,18 (Standardabweichung 67,224) und der Median der membranständigen Färbung bei HScore = 105,03 (Standardabweichung 84,604). Es zeigte sich eine unterschiedliche Verteilung je nach Lokalisation. Während bei der Membranfärbung der größte Anteil der IR-Expression in dem HScore-Bereich zwischen 50 und 100 lag, befand sich bei der Zytoplasmafärbung die höchste Anzahl der Proben in dem HScorebereich zwischen 100 und 150. Es fiel auf, dass bei insgesamt 16,4% aller Gewebeproben keine membranständige Färbung vorhanden war.

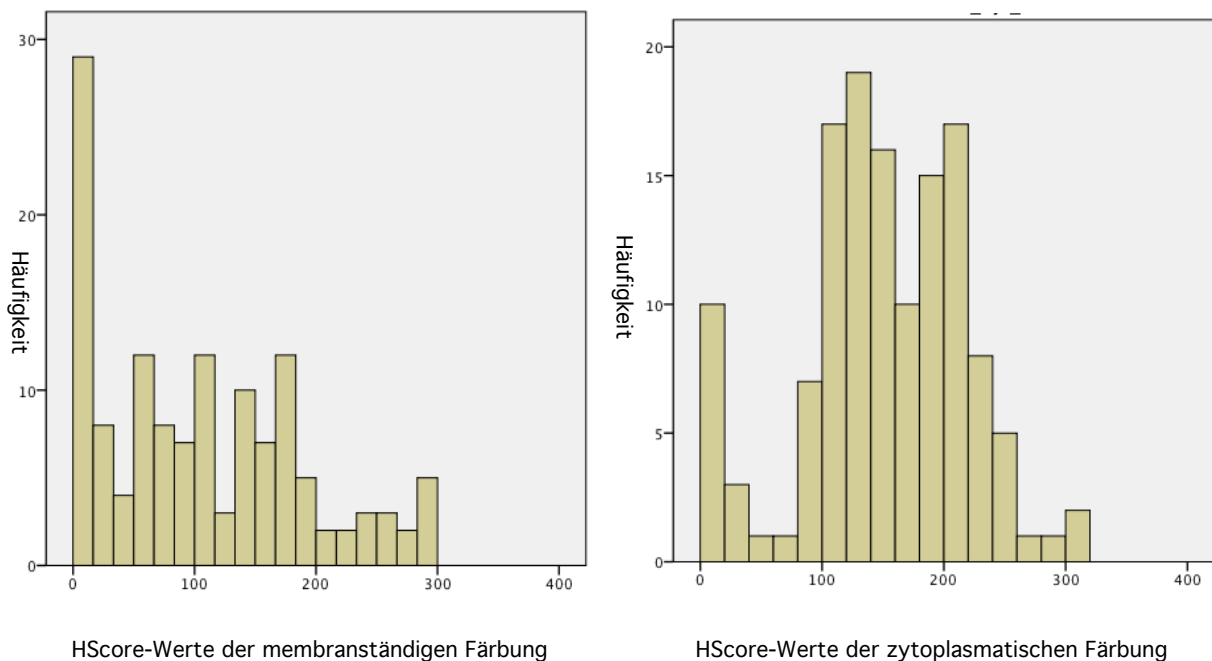


Abbildung 3.2. Darstellung der membranständigen und zytoplasmatischen Histoscore-Verteilung des Gesamtkollektivs

Membranständig war eine abnehmende Häufigkeit in höheren HScore-Intensitätsbereichen feststellbar während das Maximum zytoplasmatisch im mittleren Intensitätsbereich lag.

Histoscore- Wertebereich	Membranfärbung		Zytoplasmafärbung	
	Anzahl der Fälle	Prozent (%)	Anzahl der Fälle	Prozent (%)
0	22	16,4	8	6,0
1-50	19	14,2	6	4,5
52-100	27	20,1	20	14,9
101-150	25	18,7	41	30,6
151-200	24	17,9	37	27,6
201-250	7	5,2	18	13,4
251-300	10	7,5	4	3,0

Tabelle 3.3. Verteilung der membranständigen und zytoplasmatischen Färbung des Gesamtkollektivs

Alle Intensitätsabstufungen der membranständigen sowie der zytoplasmatischen Färbung waren in dem Gesamtkollektiv vorhanden. Darstellung der absoluten und prozentualen Anteile der Histoscorewertungen.

Die histologische Auswertung ergab, dass sich die zytoplasmatische und membranständige IR-Expression innerhalb der einzelnen Gewebeproben nicht deckungsgleich verhielt. Eine starke Membranfärbung bei schwacher Zytoplasmafärbung konnte bei den Proben ebenso beobachtet werden, wie Bereiche mit starker zytoplasmatischer Färbung und schwacher oder nicht vorhandener Membranfärbung. Eine Membranfärbung trat allerdings nur bei gleichzeitig zytoplasmatischer Färbung auf. Hingegen konnte eine zytoplasmatische Färbung auch ohne membranäre Färbung beobachtet werden.

Trotz heterogener Intensität und Verteilung der zytoplasmatischen und membranständigen Färbung innerhalb eines Zellverbandes zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen Membran- und Zytoplasmafärbung ($p=0,000$).

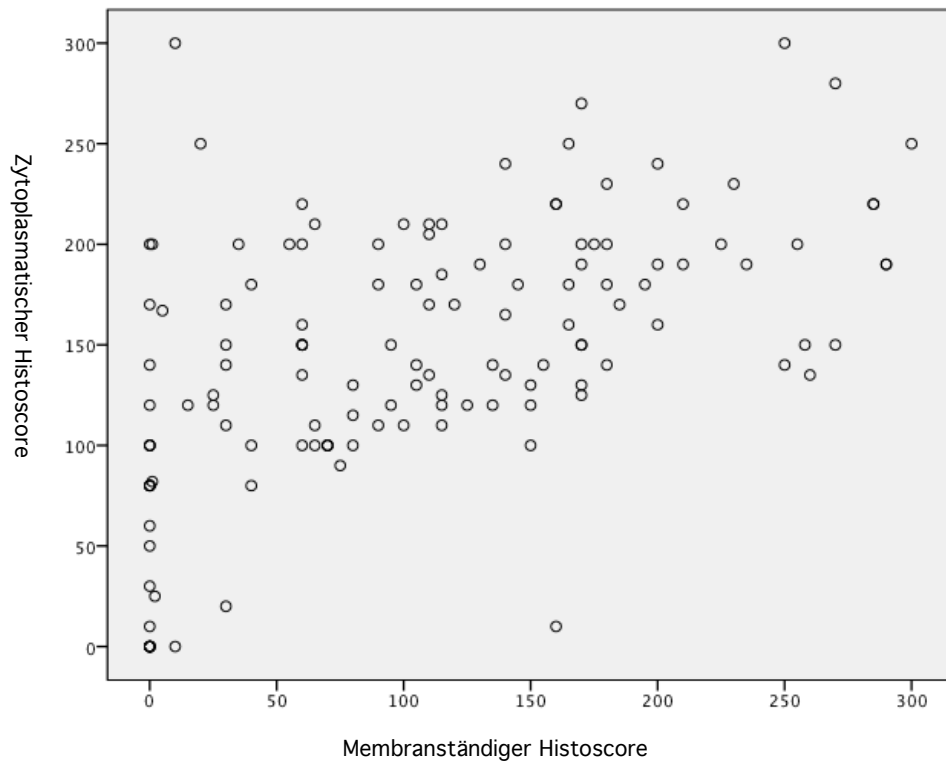


Abbildung 3.3. Korrelation zwischen der Membran- und Zytoplasmafärbung

Graphisch stellte sich im Streudiagramm eine positive lineare Korrelation zwischen der membranständigen und der zytoplasmatischen immunhistochemischen Färbung des Gesamtkollektivs anhand der Histoscore-Bewertungen dar.

Bei 41% der Gewebeproben fiel eine stärker ausgeprägte membranständige IR-Expression an der apikalen Zellmembran als an der lateralen und basalen Zellmembran auf. Die basalen und lateralen Abschnitten wiesen eine schwache oder keine membranäre Färbung auf. Die Verteilung der zytoplasmatischen Färbung verhielt sich hingegen gleichmäßig innerhalb des Zytoplasmas einer Zelle.

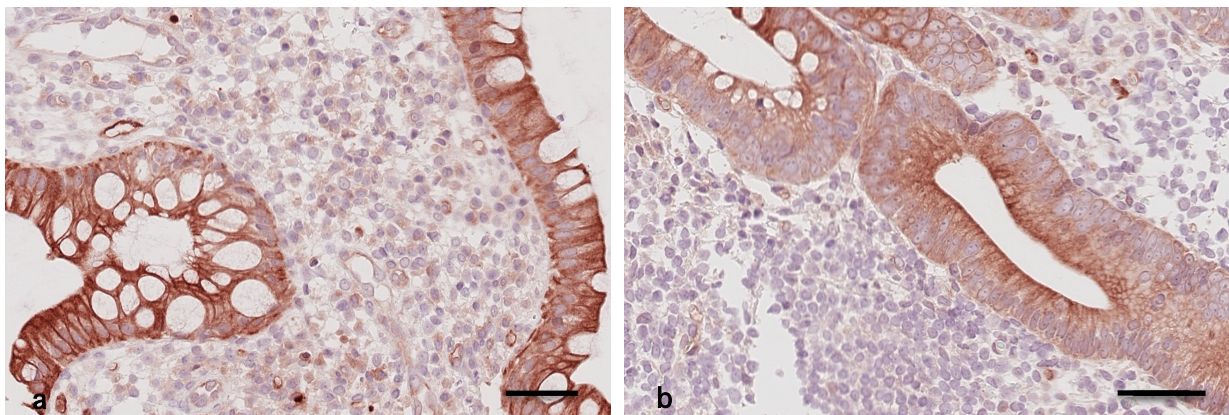


Abbildung 3.4. Die apikale Betonung der Membranfärbung

In allen Gruppen, hier beispielhaft Bildauszüge aus der Pancolitis-Gruppe (a) und Dysplasie-Gruppe (b), war eine höhere IR-Expression an der apikalen Zellmembran zu beobachten. Anti-Insulinrezeptor-Antikörper, Hämatoxylin-Gegenfärbung; Originalvergrößerung a-b: 400x, Maßstab: 1 cm = 25µm.

3.2.3. Kryptengradient

Eine weitere Beobachtung war die Zunahme der Membranfärbung entlang der Krypten mit einer maximalen Intensität in den oberen Kryptenabschnitten und am Oberflächenepithel bei multiplen Gewebeproben unterschiedlicher Gruppen. Analog zu diesem membranständigen Gradienten entlang einer Krypte konnte ebenfalls eine Zunahme der zytoplasmatischen Färbung zur Oberfläche hin beobachtet werden. Teilweise war in der Basis der Krypte keine IR-Expression nachweisbar.

Der Kryptengradient war mit einer Ausnahme bei allen Fällen der Kontrollgruppe zu beobachten. Die Auswertung der Fälle mit CU zeigte ein häufigeres Auftreten des Kryptengradienten bei Pancolitis im Vergleich zu Linksseitenkolitis und Dysplasie. Bei kolorektalen Adenomen fiel eine stärkere Ausprägung des Gradienten in dem Umgebungsgewebe der Adenome als in den Adenomen selbst auf. Nur bei den Zellverbänden der Kolonkarzinome wurde kein Kryptengradient beobachtet.

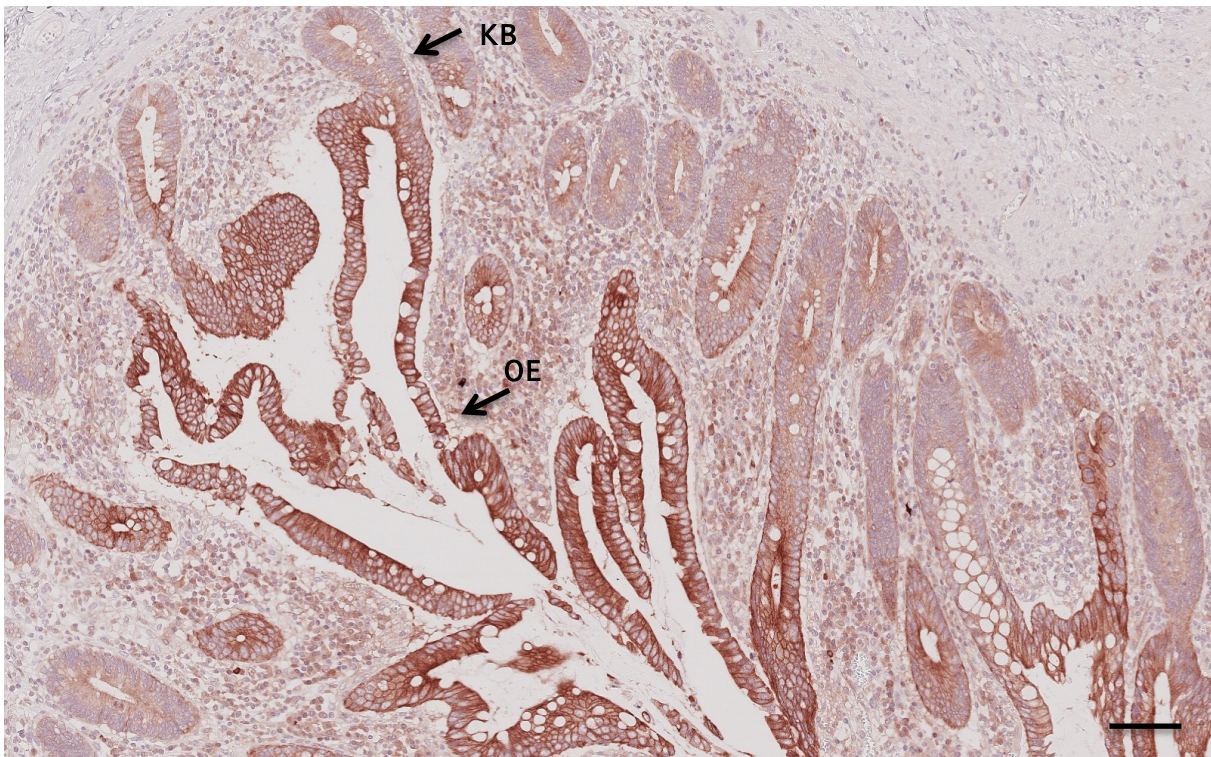


Abbildung 3.5. Der Kryptengradient

Eine häufige Beobachtung war der Gradient entlang der Krypte mit Zunahme der IR-Expression zu der luminalen Oberfläche des Epithels (OE). In den Epithelzellen der Kryptenbasis (KB) war ein schwacher bis kein membranständiger IR-Nachweis vorhanden. Hier exemplarisch ein Beispiel aus der Dysplasie-Gruppe, Anti-Insulinrezeptor-Antikörper, Hämatoxylin-Gegenfärbung; Originalvergrößerung: 100x, Maßstab: 1cm = 100µm.

Gruppe	Gesamtanzahl	Absolute Häufigkeit	Relative Häufigkeit in %
Adenom	20	7	35,0
Adenom-Umgebung	19	15	78,9
Dysplasie	26	6	23,0
Dysplasie-Umgebung	24	5	20,8
Karzinom	9	0	0,0
Pancolitis ulcerosa	10	7	70,0
Linksseitencolitis ulcerosa	16	6	37,5
Kontrollgruppe	10	9	90,0
Insgesamt	134	55	41,0

Tabelle 3.4. Vorkommen des Kryptengradienten im Gruppenvergleich

In allen Gruppen außer bei Karzinomen wurde ein Kryptengradient beobachtet. Am häufigsten kam dieser in der Kontrollgruppe und in dem Umgebungsgewebe der kolorektalen Adenome vor.

3.3. Colitis ulcerosa-assoziierte Dysplasie und nicht-dysplastisches Umgebungsgewebe

Die Gruppe der CU-assoziierten Dysplasien beinhaltete dysplastisches sowie nicht-dysplastisches Gewebe. Beides wurde separat ausgewertet und anschließend verglichen.

Bei der Dysplasie-Gruppe variierte die IR-Expression zwischen den Proben. Die immunhistochemische Färbung wies in den dysplastischen Anteilen der Mukosa eine besonders große Heterogenität der Färbeintensität auf. Die HScore-Werte befanden sich zwischen 0 und 290 (membranär) bzw. 0 und 300 (zytoplasmatisch). Insgesamt war die IR-Expression leicht bis mäßig stark ausgeprägt, wobei die zytoplasmatische Expression (Medianer HScore: 140) geringfügig stärker war als die membranständige (Medianer HScore: 107,5). Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen der membranständigen und zytoplasmatischen Färbung der Dysplasien nachgewiesen werden ($p = 0,000$).

Das nicht-dysplastischen Gewebe beinhaltete HScore-Werte im Bereich zwischen 0 und 290 (membranär) bzw. 0 und 220 (zytoplasmatisch). Diese Gruppe wies im gesamten Kollektiv die geringste zytoplasmatische Färbung (Medianer HScore: 100) sowie membranständige Färbung (Medianer HScore: 20) auf. Hier war bei 50% der Gewebeproben keine membranständige Färbung vorhanden (HScore: 0). Auch bei den nicht-dysplastischen Gewebebereichen war der Zusammenhang zwischen membranärer und zytoplasmatischer Färbung signifikant ($p = 0,000$).

Die statistische Analyse ergab einen signifikanten Unterschied der IR-Expression zwischen dem dysplastischen und dem nicht-dysplastischen Gewebe. Sowohl die membranständige Färbung als auch die zytoplasmatische Färbung im dysplastischen Areal waren signifikant höher als im nicht-dysplastischen Areal (membranär: $p = 0,035$, zytoplasmatisch: $p = 0,044$). Zwar bestand somit insgesamt rein rechnerisch eine höhere IR-Expression in den dysplastischen Bereichen, diese ließen sich allerdings histologisch nicht auf einen Blick hin anhand der IR-Expression identifizieren. Eine ausgeprägte IR-Expression konnte an dysplastischen Zellen genauso beobachtet werden wie an nicht-dysplastischen Zellen.

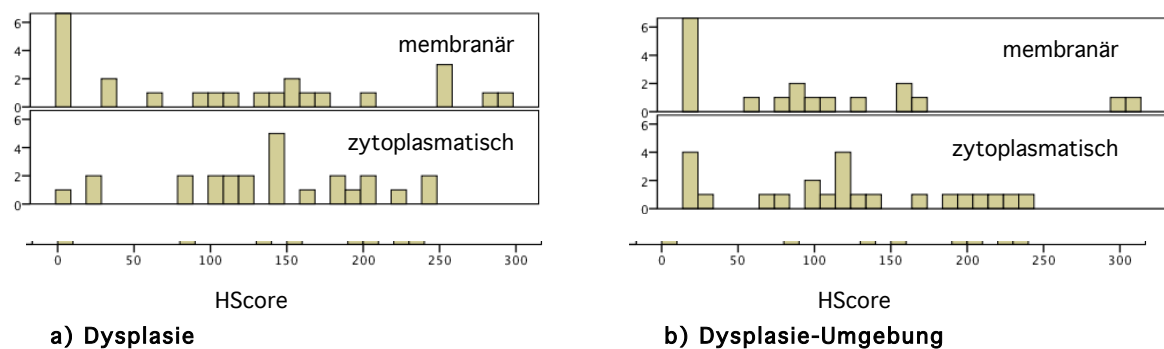


Abbildung 3.6. Verteilung der HScore-Werte der membranständigen und zytoplasmatischen IR-Expression in der Dysplasie und in dem Umgebungsgewebe der Dysplasie

Es fällt der große Anteil ohne membranständige IR-Expression bei beiden Gruppen auf. Bei den nicht-dysplastischen Bereichen war vergleichsweise eine geringere membranständige IR-Expression vorhanden.

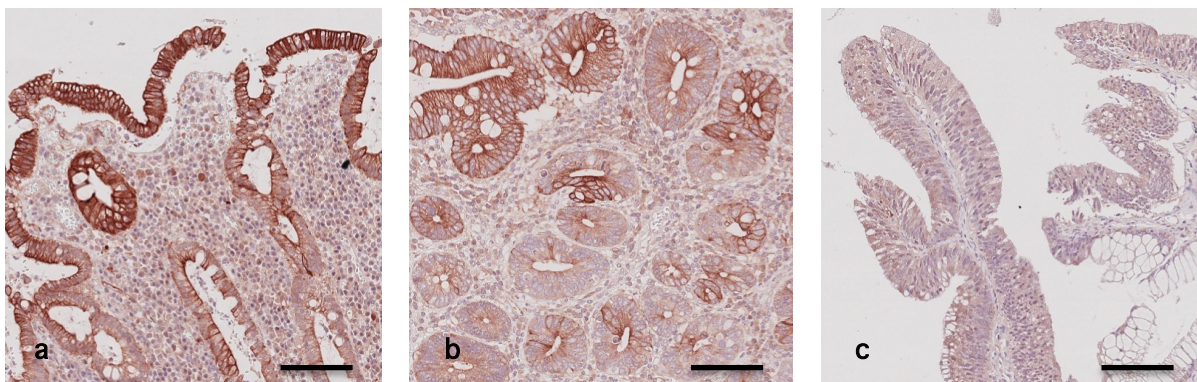


Abbildung 3.7. Die Verteilung der IR-Expression in dysplastischem und nicht-dysplastischem Gewebe

Bei der Dysplasie-Gruppe war kein einheitliches IR-Expressionsmuster zu beobachten. Beispiele einer starken membranären IR-Expression (a) bis keiner membranären IR-Expression (c). Anti-Insulinrezeptor-Antikörper, Hämatoxylin-Gegenfärbung; Originalvergrößerung a-c: 100x, Maßstab: 1 cm = 100µm.

Der statistische Vergleich zwischen der Dysplasie-Gruppe und der Kontrollgruppe in Bezug auf die membranständige sowie die zytoplasmatische IR-Expression ergab keinen signifikanten Unterschied (membranär: $p = 0,669$, zytoplasmatisch: $p = 0,243$). Ebenfalls nicht signifikant war der Unterschied zwischen der Dysplasie-Gruppe und der Karzinom-Gruppe ($p = 0,676$).

3.4. Nicht-dysplastische Mukosa von Patienten mit Colitis ulcerosa

Die epitheliale IR-Expression zeigte eine Abhängigkeit von dem Ausmaß der Entzündungsaktivität der CU. Patienten mit einer Pancolitis ulcerosa wiesen eine stärkere epitheliale IR-Expression auf als Patienten mit einer Linksseitencolitis. Ferner ergab die statistische Analyse im Gruppenvergleich die stärkste membranständige IR-Expression bei Gewebeproben von Patienten mit Pancolitis ulcerosa. Der Median der Membranfärbung lag hier bei dem HScore-Wert 185. Die zytoplasmatische Färbung war weniger intensiv ausgeprägt, aber nichtsdestotrotz mit einem HScore-Median von 150 und dem maximalen HScore-Wert von 200 mäßig. Die Pancolitis-Gruppe war die einzige Gruppe mit einer durchschnittlich schwächer ausgeprägten Zytoplasmafärbung als Membranfärbung. Eine Korrelation zwischen Membran- und Zytoplasmafärbung konnte hier nicht nachgewiesen werden ($p = 0,583$).

Bei der Gruppe der Linksseitencolitis lag der Median der Membranfärbung bei einem HScore-Wert von 92,5 und der Median der Zytoplasmafärbung bei dem HScore-Wert 130. Hier bestand eine signifikante Korrelation zwischen Membranfärbung und Zytoplasmafärbung ($p = 0,000$).

Die histologische Auswertung der immunhistochemischen Färbung ergab den IR-Nachweis nicht nur epithelial sondern auch in den Endothelien. Eine starke vaskuläre IR-Expression war bei dem Gewebe mit Pancolitis zu beobachten. Hier war bei 90% Prozent der Proben (9/10) eine vaskuläre IR-Expression vorhanden, welche überwiegend als stark eingestuft wurde. Es war eine Zunahme der Intensität der vaskulären IR-Expression in Annäherung an die Mukosa zu beobachten. Die Lokalisation der stärksten Endothelfärbung befand sich direkt subepithelial. Bei den Gewebeproben von Patienten mit Linksseitencolitis wurde nur vereinzelt eine vaskuläre IR-Expression beobachtet. Auch bei fast allen anderen Gruppen des Kollektivs trat die vaskuläre IR-Expression nur vereinzelt auf. Bei der Kontrollgruppe war in 2 der 10 Proben eine vaskuläre IR-Expression vorhanden. 80% der kolorektalen Adenome (16/20) zeigten zwar eine vaskuläre IR-Expression, diese war aber überwiegend schwach und nur in einem

Adenom mittelstark ausgeprägt. Bei den Dysplasie-Gewebeproben ließ sich bei nur zwei Fällen eine vaskuläre IR-Expression beobachten, welche jeweils schwach ausgeprägt war.

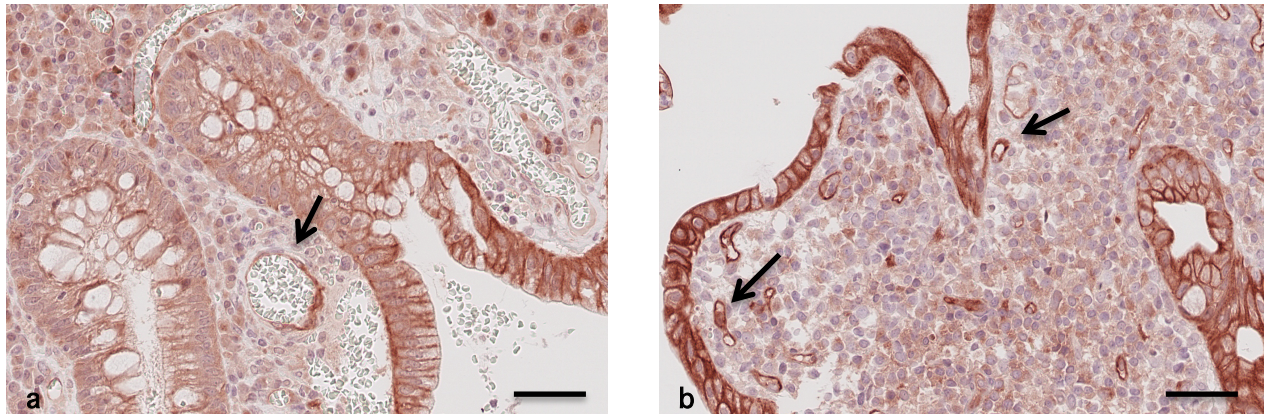


Abbildung 3.8. Die Endothelfärbung bei der Pancolitis

Die endotheliale IR-Expression subepithelial bei Patienten mit Pancolitis ulcerosa, hier exemplarisch mit Pfeilen markiert. Anti-Insulinrezeptor-Antikörper, Hämatoxylin-Gegenfärbung; Originalvergrößerung a-b: 400x, Maßstab: 1 cm = 25µm..

3.5. Colitis ulcerosa-assoziiertes Kolonkarzinom

Die Auswertung der neun cCRC zeigte eine heterogene Verteilung der epithelialen IR-Expression. Die Heterogenität der IR-Expression war hier im Gruppenvergleich am stärksten ausgeprägt. Ein IR-Kryptengradient wurde nicht beobachtet. Innerhalb der Karzinome lagen Areale mit starker IR-Expression unmittelbar neben Arealen mit schwacher Expression, wodurch sich ein heterogenes Bild ergab.

Es wurde ein muzinöses Adenokarzinom untersucht. Bei diesem war weder eine membranständige noch eine zytoplasmatische Färbung vorhanden.

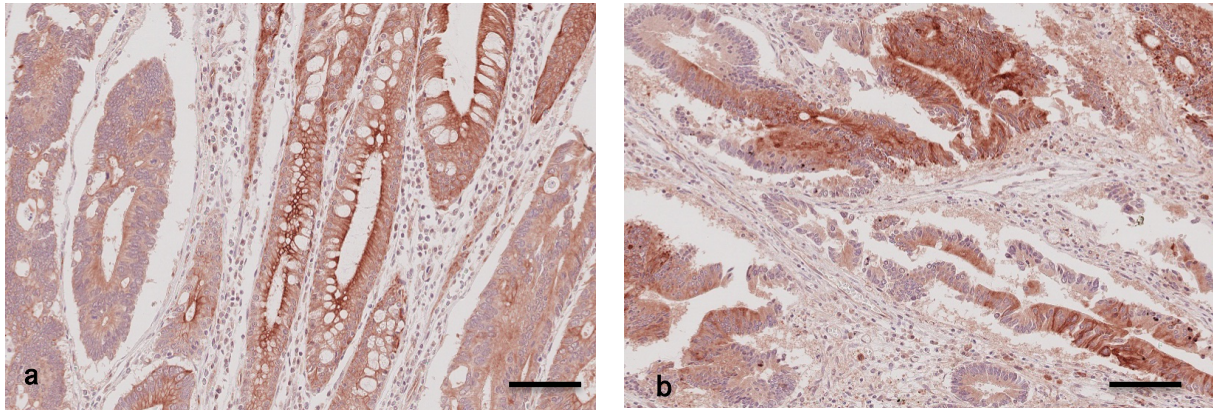


Abbildung 3.9. Die Insulinrezeptorexpression bei Colitis ulcerosa-assoziierten Adenokarzinomen

Darstellung der Heterogenität der zytoplasmatischen und membranständigen IR-Expression innerhalb der Karzinome. Anti-Insulinrezeptor-Antikörper, Hämatoxylin-Gegenfärbung; Originalvergrößerung a-b: 100x, Maßstab: 1cm = 100µm.

Bei den Gewebeproben der cCRC war eine vaskuläre IR-Expression vorhanden. Die vaskuläre IR-Expression war am stärksten in den Kapillaren in unmittelbarer Umgebung der Tumorzellen ausgeprägt. Diese Kapillaren wiesen eine stärkere IR-Expression als vergleichsweise größere Gefäße auf. Innerhalb der cCRC war eine Abnahme der vaskulären IR-Expression nach peripher zu beobachten. Bei dem miterfassten nicht-karzinomatösen Darmgewebe der Proben existierte keine vaskuläre IR-Expression.

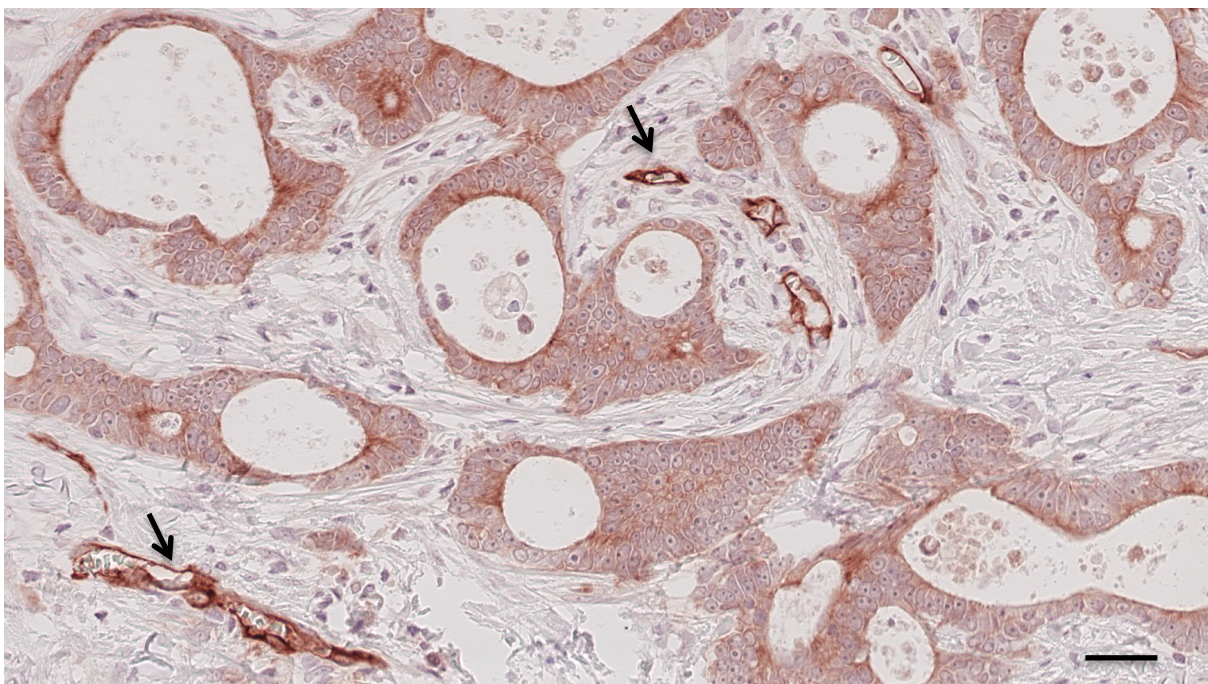


Abbildung 3.10. Die vaskuläre IR-Expression eines Colitis ulcerosa-assoziierten Adenokarzinoms

Beispielhafte Darstellung der vaskulären IR-Expression in einem cCRC, exemplarisch mit Pfeilen markiert. Anti-Insulinrezeptor-Antikörper, Hämatoxylin-Gegenfärbung; Originalvergrößerung: 200x, Maßstab: 1cm = 50µm.

3.6. Low-grade Adenome und nicht-adenomatöses Umgebungsgewebe

Die 20 Gewebeproben von kolorektalen Adenomen beinhalteten sowohl Adenomgewebe, als auch nicht-adenomatöses Gewebe. Bei einer Gewebeprobe war allerdings ausschließlich Adenom vorhanden. Bei der Auswertung wurden die Adenome und die umgebende Mukosa getrennt beurteilt.

Charakteristisch für das adenomatöse Gewebe war der ausschließlich zytoplasmatische IR-Nachweis. Eine deutliche Abgrenzung zeigte sich zu dem umgebenden, nicht-adenomatösen Gewebe, denn hier war eine membranständige IR-Expression deutlich vorhanden. Die bei den Adenomen schwache oder fehlende membranäre IR-Expression spiegelte sich in einem niedrigen medianen HScore-Wert von 57,5 wider. Im Gegensatz dazu war in dem umgebenden nicht-adenomatösen Gewebeanteil eine deutliche membranständige IR-Expression vorhanden. Hier lag der mediane HScore-Wert bei 130, welches der zweithöchsten medianen Intensität der Membranfärbung im Gruppenvergleich entspricht. Dieser Unterschied der membranären IR-Expression erwies sich als statistisch signifikant ($p = 0,000$).

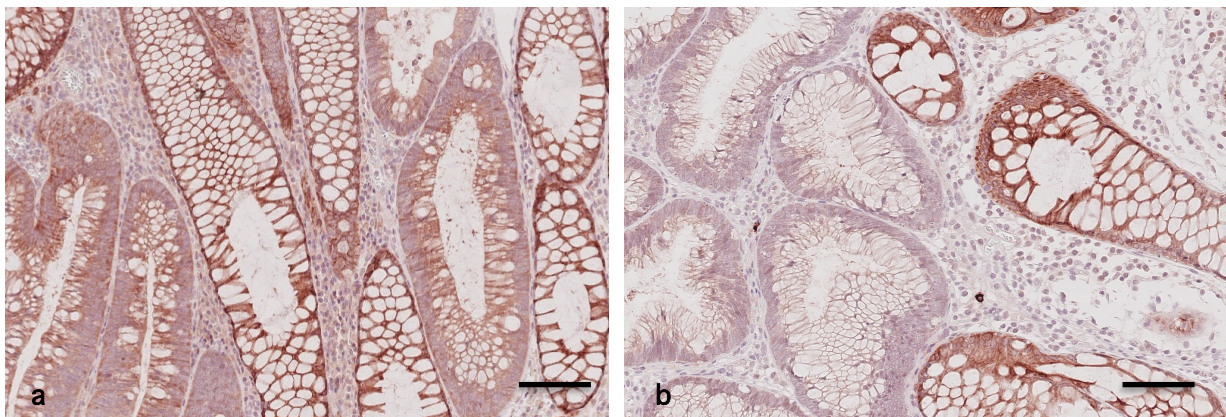


Abbildung 3.11. Verteilung der IR-Expression der kolorektalen Adenome und des nicht-adenomatösen Gewebes im Vergleich

Jeweils deutliche Unterscheidung des adenomatösen Anteils des Gewebes (ohne membranständige IR-Expression) und des nicht-adenomatösen Gewebeanteils (mit membranständiger IR-Expression). Anti-Insulinrezeptor-Antikörper, Hämatoxylin-Gegenfärbung; Originalvergrößerung a-b: 200x, Maßstab: 1 cm = 50µm..

Zytoplasmatisch war der IR-Nachweis bei dem Adenom und dem entsprechenden Umgebungsgewebe häufig übereinstimmend ausgeprägt. Für beide Gewebeanteile, Adenom und nicht-adenomatöse Mukosa, wurde für die Zytoplasmafärbung der mediane HScore-Wert

165 berechnet. Auch statistisch konnte kein signifikanter Unterschied der zytoplasmatischen IR-Expression zwischen Adenom und Umgebungsgewebe festgestellt werden ($p = 0,360$).

Eine Korrelation zwischen der membranären und zytoplasmatischen Färbung lag bei den Adenomen nicht vor ($p = 0,669$). Auch bei den nicht-adenomatösen Gewebeanteilen ließ sich keine Korrelation nachweisen ($p = 0,084$).

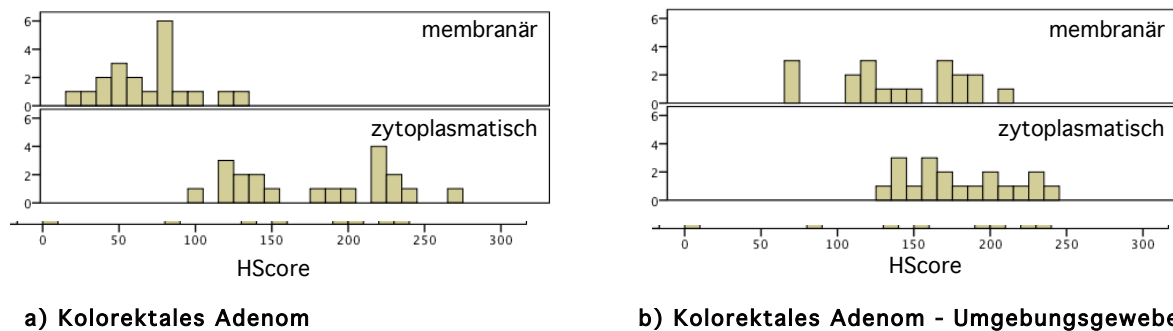


Abbildung 3.12. Graphische Darstellung Verteilung der Histoscore-Werte der membranständigen und zytoplasmatischen IR-Expression in Adenom und Umgebungsgewebe

Die graphische Darstellung der HScore-Wertungen verdeutlicht die gering ausgeprägte membranständige IR-Expression bei kolorektalen Adenomen.

3.7. Kontrollgruppe

Die IR-Expression der Kontrollgruppe unterschied sich nicht signifikant von den anderen Gruppen. Bei den Vergleichen zwischen dem membranständigen IR-Nachweis (Dysplasie: $p = 0,669$, Kolorektales Adenom: $p = 0,311$, Pankolitis: $p = 0,108$) und dem zytoplasmatischen IR-Nachweis (Dysplasie: $p = 0,243$, Kolorektales Adenom: $p = 0,493$, Pankolitis: $p = 0,223$) zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Das Bild der immunhistochemischen Färbung war auch in diesen Gewebeproben heterogen, mit starker sowie schwacher IR-Expression in verschiedenen Bereichen. Es war eine starke zytoplasmatische Färbung zu beobachten. Der mediane HScore lag hier bei dem Wert 195. In 50% der Proben (5/10) kamen Bereiche mit einer Zytoplasmafärbung der höchsten Intensität (Intensitätsstufe 3) vor, während nur in einer Probe ein Bereich ohne zytoplasmatische Färbung (Intensitätsstufe 0) vorhanden war. Insgesamt erwies sich die Membranfärbung mit einem medianen HScore von 155 schwächer als die Zytoplasmafärbung. Bei 70% der Proben (7/10) war eine starke IR-Expression (Intensitätsstufe 3) vorhanden. Ein Kryptengradient konnte bei 80% (8/10) der Kontrollproben beobachtet werden.

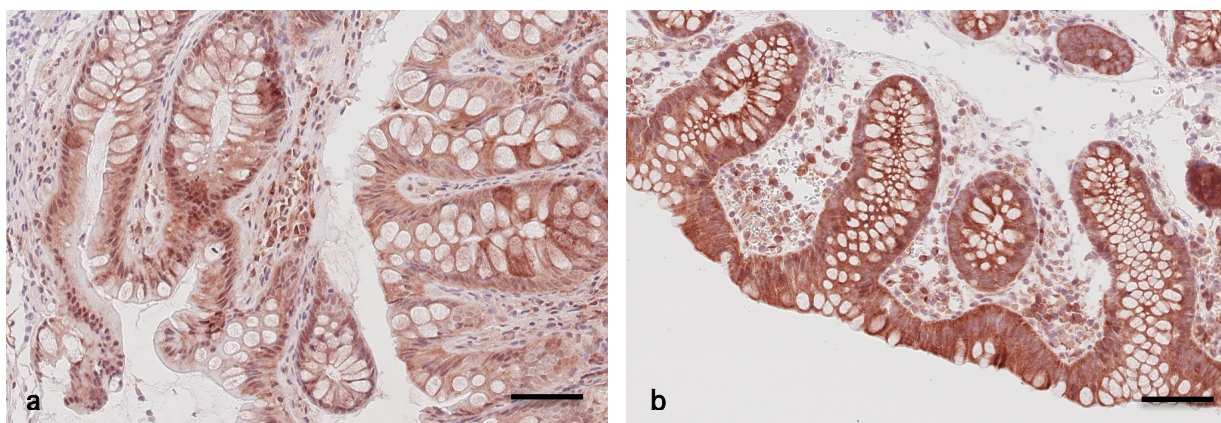


Abbildung 3.13. Epitheliale Insulinrezeptorexpression bei der Kontrollgruppe

Beispiele aus der Kontrollgruppe mit unterschiedlicher Ausprägung der membranständigen und zytoplasmatischen IR-Expression. Es wurde im Gruppenvergleich eine starke IR-Expression beobachtet. Anti-Insulinrezeptor-Antikörper, Hämatoxylin-Gegenfärbung; Originalvergrößerung a-b: 200x, Maßstab: 1 cm = 50µm.

3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse

Gruppe	Histoscore-Median, zytoplasmatisch	Histoscore-Median, membranständig
Kolorektales Adenom	165	58
Kolorektales Adenom-Umgebung	165	130
Dysplasie	140	108
Dysplasie-Umgebung	100	20
Colitis ulcerosa assoziiertes Karzinom	170	115
Pankolitis (Montreal-Klassifikation E3)	150	185
Colitis ulcerosa (Montreal-Klassifikation E2)	130	93
Kontrolle	195	155
Gesamtkollektiv	145,18 (σ: 67,224)	105,03 (σ: 84,604)

Tabelle 3.5. Medianer Histoscore der zytoplasmatischen und membranständigen Insulinrezeptorexpression im Gruppenvergleich

Insgesamt war fast in dem gesamten Kollektiv eine Heterogenität des Färbemusters zu beobachten. Ein epithelialer IR-Nachweis war an der Plasmamembran sowie auch im Zytoplasma vorhanden. Dabei war die zytoplasmatische Färbung vergleichsweise stärker ausgeprägt als die Membranfärbung und es bestand eine signifikante Korrelation zwischen Membran- und Zytoplasmafärbung. Ferner wurde eine Zunahme der Membranfärbung entlang

der Krypten mit einer maximalen Intensität in den oberen Kryptenabschnitten und am Oberflächenepithel beobachtet und als Kryptengradient bezeichnet.

Die CU-assoziierten Dysplasien zeichneten sich ebenfalls durch eine Heterogenität der Färbintensität aus. Trotz signifikantem Unterschied der IR-Expression zwischen dem dysplastischen und dem nicht-dysplastischen Umgebungsgewebe konnte die Dysplasie histologisch nicht anhand der IR-Expression identifiziert werden. Es bestand kein signifikanter Unterschied der IR-Expression der Dysplasie-Gruppe und der Kontrollgruppe.

Die epitheliale IR-Expression zeigte eine Abhängigkeit von dem Ausmaß der Entzündungsaktivität der CU. Ein ähnlicher Trend zeigte sich bei der vaskulären IR-Expression. Diese trat subepithelial auf und war am stärksten bei der Pancolitis ausgeprägt. Auch bei den cCRC trat eine vaskuläre IR-Expression in den Kapillaren in unmittelbarer Umgebung der Tumorzellen auf.

Deutlich anders stellte sich die IR-Expression der kolorektalen Adenome dar. Hier war ausschließlich ein zytoplasmatischer IR-Nachweis vorhanden und somit war eine deutliche Abgrenzung der Adenome von dem nicht-adenomätösem Umgebungsgewebe zu beobachten, bei dem durchaus eine membranäre IR-Expression vorhanden war.

4. Diskussion

4.1. Klinische Relevanz der Studie

In dieser Studie untersuchten wir die IR-Expression in den Karzinomvorstufen Adenom und Dysplasie. Aufbauend auf den Arbeiten von Abbruzzese et al. und Bjerrum et al. ergab sich die Hypothese, dass die Expression des IR bedeutend ist für die Karzinogenese von kolorektalen Karzinomen unterschiedlicher Genese.^{138,139} Da sich die Karzinogenese des sCRC und des cCRC unterscheiden, sollte die getrennte Betrachtung der IR-Expression in den jeweiligen Karzinomvorstufen Rückschlüsse auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Tumorentwicklung ermöglichen.³⁵ Zudem sollte untersucht werden, ob sich der IR als Marker für die Diagnostik von kolorektalen Präkanzerosen im Rahmen der Krebsfrüherkennung eignet.

Die molekulargenetischen Veränderungen im Zuge der Karzinogenese des sCRC und cCRC sind im Sinne der Adenom-Karzinom-Sequenz und Dysplasie-Karzinom-Sequenz bekannt.^{12,31} Darüber hinaus existieren weitere Einflussfaktoren, die das Karzinomrisiko erhöhen.³ Ein Zusammenhang konnte bei Alkoholkonsum, Nikotinkonsum, Übergewicht, Diabetes mellitus Typ 2 und der damit verbundenen Insulinresistenz gezeigt werden.^{3,5} Als Teil des Insulin/IGF-Systems scheint der IR über vielfältige Wirkungsweisen an der Entstehung von Adenokarzinomen beteiligt.⁹⁰ Mitogene und proliferative Signalkaskaden werden durch die Bindung von Insulin, IGF-1 und -2 an den IR-A ausgelöst.^{87,90} Die Zellteilung kann durch die Translokation von IRS-1 in den Zellkern gefördert werden und durch die Induktion einer Apoptoseresistenz kommt es zu einem längeren Überleben der Tumorzellen.^{87,90}

Der frühzeitige Nachweis von kolorektalen Karzinomvorstufen ist für Patienten prognostisch relevant, da mit adäquater Therapie der Präkanzerose eine Karzinomentstehung verhindert werden kann.¹ Die Koloskopie als Früherkennungsdiagnostik und die histologische Aufarbeitung der Biopsien sind der Goldstandard zur Erstdiagnostik und Kontrolle kolorektaler Adenome.² Dies ist mit hohem Aufwand und Kosten verbunden.¹³ Genaue Marker zur Risikoeinschätzung sind notwendig, um eine effiziente Früherkennung und Behandlung zu gewährleisten.¹³ Zudem ist bei Patienten mit CU die Unterscheidung zwischen entzündlich-regenerativen und dysplastischen Veränderungen der Mukosa anhand der Histologie nicht immer sicher möglich.

Bjerrum et al. wiesen bei Patienten mit CU eine höhere IR-Expression bei der Dysplasie im Vergleich zu Pancolitis- und Linksseitencolitispatienten ohne Dysplasien nach.¹³⁹ Abbruzzese

et al. beschreiben eine höhere Expression des IR in sporadischen kolorektalen Adenomen als in geringgradig differenzierten Karzinomen und eine wiederum niedrigere Expression in hochgradig differenzierten Karzinomen.¹³⁸ Dies könnte eine Beteiligung des IR besonders im Rahmen der frühen Karzinogenese bedeuten. Im Falle einer charakteristischen IR-Überexpression in Dysplasien und/oder Adenomen könnte der IR als Marker die histologische Diagnostik erweitern.

Darüber hinaus entstehen durch die Erforschung der molekulargenetischen Details der Karzinomentstehung neue Angriffspunkte für spezifische zielgerichtete Therapien („targeted molecular therapy“).^{65,94} Bisherige Versuche der zielgerichteten Tumorthherapie durch Eingriffe in das Insulin/IGF-System wirkten zwar in präklinischen Versuchen vielversprechend, stellten sich allerdings in klinischen Studien dann als nicht einsetzbar heraus.^{90,94} Zum Einen besteht der Ansatz der direkten Rezeptorhemmung, wobei IGF-1R-Antikörper in klinischen Versuchen scheiterten, möglicherweise aufgrund der ersatzweisen Signaltransduktion durch den IR-A.⁹⁴ Antikörper, welche sowohl IGF-1R wie auch IR inhibieren, zeigten eine sehr hohe Toxizität oder unzureichende Wirkung.⁹⁴ Ein weiterer Ansatz ist die Hemmung der Liganden, wobei die generelle Hemmung von Insulin aufgrund der ubiquitären Wirkung im Organismus nicht vorstellbar ist.⁹⁴

Hyperinsulinämie und Insulinresistenz und die damit verbundenen metabolischen Veränderungen bei Diabetes mellitus Typ 2 werden als Einflussfaktoren für ein erhöhtes Karzinomrisiko angesehen.¹³¹ Somit ist die adäquate Therapie mit konsequenter Blutzuckereinstellung ein wichtiger Faktor zur Reduktion des CRC-Risikos.¹³¹ Ein genaueres Verständnis des Zusammenspiels der Liganden und Rezeptoren des Insulin/IGF-Systems sowie die Kenntnis über spezifische Expressionsmuster und Wirkweisen sind notwendig, um selektive Therapeutika zu entwickeln.

4.2. Interpretation der immunhistochemischen Ergebnisse

Die Hypothese, dass der IR vermehrt in den Präkanzerosen von sCRC und cCRC exprimiert wird, konnte in unseren Experimenten nicht bestätigt werden. Im Vergleich zu der gesunden und entzündlich veränderten Darmschleimhaut der Vergleichsgruppen zeigte sich keine signifikant erhöhte IR-Expression in der Dysplasie bei CU und auch nicht in sporadischen low-grade Adenomen.

4.2.1. Zytoplasmatische und membranständige Insulinrezeptorexpression

Die immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper „INSR β 4B8“ (Cell Signalling) zeigte sowohl eine membranständige, als auch zytoplasmatische IR-Expression in unseren Vergleichsgruppen. Der membranständige Nachweis des IR entspricht der membranären Expression von Tyrosinkinaserzeptoren.⁶² Die membranäre IR-Expression wurde in stärkerem Maße an der apikalen Zellmembran als an den lateralen und basalen Membranabschnitten beobachtet. Durch die luminale Oberflächenvergrößerung der Enterozyten mittels Mikrovilli ist die Membrandichte an der apikalen Oberfläche stark erhöht, sodass der Eindruck einer höheren IR-Konzentration entstehen kann.¹⁴⁰ Im Gruppenvergleich zeigte sich bei den Proben von Patienten mit CU der Trend einer stärkeren IR-Expression mit steigendem Ausmaß der Entzündung. Diese Beobachtung traf insbesondere auf die membranständige IR-Expression zu. Bei der Pankolitis war im Gruppenvergleich die höchste membranständige IR-Expression zu beobachten. Diese vergleichsweise stärkere membranäre IR-Expression könnte auf ein hohes Maß an Rezeptorrecycling zurückzuführen sein, wodurch die Rezeptoren nach Ligandenbindung und Internalisierung rasch wieder an der Plasmamembran exprimiert werden.

Die Beobachtung der zytoplasmatischen IR-Expression stimmt mit den Ergebnissen von Abbruzzese et al. überein.¹³⁸ Gemäß der Physiologie des Tyrosinkinaserektors entspricht der zytoplasmatische IR-Nachweis dem internalisierten aktivierten Rezeptor.^{51,80} Der ausgeprägte zytoplasmatische IR-Nachweis kann für die endosomale Lokalisation des IR sprechen, welche mit mitogenen Signalen assoziiert ist.^{81,130} Die Regulation der Endozytose durch die Rezeptorisoform und den Liganden sind Möglichkeiten, um die Dauer der Aktivierung und die Signalweiterleitung zu beeinflussen.¹³⁰ Es wird vermutet, dass die IGFs und Insulin verschiedene Auswirkungen auf die IR-Verarbeitung und Wirkung haben.⁵¹ Die Bindung von Insulin an den IR-A ist mit einer vermehrten Internalisierung und Degradation des Rezeptors assoziiert, während die Bindung von IGF-2 eine verlängerte mitogene Signalweiterleitung des IR-A induziert.⁵¹ Die Insulinstimulation des IR-B scheint hingegen eine überwiegend metabolische Signalweiterleitung auszulösen.^{51,141} Bei der Gruppe der kolorektalen Adenome fiel die fehlende membranständige IR-Expression bei einem fast ausschließlich zytoplasmatischen IR-Nachweis auf. Dies scheint für das Vorliegen des Rezeptors in aktiviertem Zustand zu sprechen. Vorstellbar wäre auch eine entsprechende mitogene Wirkung bei endosomaler Lokalisation.¹³⁰

Ferner ist eine Translokation von Tyrosinkinaserzeptoren, auch des IR, in den Zellkern bekannt.⁵¹ Möglicherweise kann der Rezeptor im Nukleus als Transkriptionsfaktor direkten

Einfluss auf die Genexpression nehmen. Da in unserer Studie ausschließlich die zytoplasmatische und membranäre IR-Expression untersucht wurden, kann über eine mögliche nukleäre IR-Transposition keine Aussage getroffen werden.

Es besteht insgesamt eine positive Korrelation zwischen membranständigem und zytoplasmatischem IR-Nachweis in unserem Kollektiv. Daraus lässt sich schließen, dass sich eine IR-Überexpression sowohl auf die membranständige Expression als auch auf die IR-Internalisierung und zytoplasmatischen IR-Lokalisation auswirkt.

4.2.2. Verteilung der Insulinrezeptorexpression im Gewebe

Die Expression des IR in unseren Gewebeproben war durch ein heterogenes Muster geprägt. Innerhalb eines Epithelverbandes gab es Epithelabschnitte mit starker und schwacher oder fehlender IR-Expression. Besonders bei den dysplastischen Bereichen sowie bei entzündlich veränderten Arealen und im Kolonkarzinom war die IR-Expression abschnittsweise deutlich heterogen.

Diese Heterogenität ist möglicherweise auf lokale Unterschiede des Zellumsatzes und Energieverbrauchs zurückzuführen. Die entzündlichen Prozesse der CU führen zu Schäden der Enterozyten, sodass ein ständiger Wiederaufbau des Gewebes abläuft.⁵¹ Die proliferierenden Zellen benötigen große Mengen an Glukose zur Deckung des Energiebedarfs sowie für die Produktion der Zellbestandteile.³² In seiner metabolischen Funktion induziert der IR den Einbau von GLUT-Transportern und somit die Bereitstellung von Glukose.^{49,51} Dadurch kann der IR zur Deckung des Energiebedarfs durch den Einstrom von Glukose in die Zelle beitragen.^{51,71} Der IR-A ist durch direkte Bindung an GLUT-1 und -2 mit einer erhöhten basalen Glukoseaufnahme in die Zelle assoziiert.⁵¹ Neben der metabolischen Funktion können durch den IR außerdem proliferative und mitogene Signale den Wiederaufbau des Gewebes anregen.⁵¹ Die heterogene Ausprägung der IR-Expression könnte somit Ausdruck der lokal unterschiedlich starken Entzündungsaktivität bei Gewebeproben mit CU sein und der IR hypothetisch als Indikator des hohen Zellumsatzes und des entsprechend erhöhten Energiebedarfs angesehen werden.

Bei der Pancolitis war kaum Heterogenität zu beobachten. Die einheitlich stark ausgeprägte IR-Expression ist mutmaßlich auf den hohen Zellumsatz und Energiebedarf des gesamten Gewebes aufgrund der global stark ausgeprägten Entzündung zurückzuführen. Währenddessen war bei Gewebeproben mit insgesamt geringem Entzündungsgrad ein höheres Maß an Heterogenität vorhanden. Hier könnte in entzündlich veränderten Bereichen des

Epithels ein höherer Energiebedarf die stärkere IR-Expression bedingen, während in Bereichen mit geringerer Entzündungsaktivität ein geringerer Energieverbrauch vorhanden ist. Es bedarf zukünftiger Studien, um weitere Einsicht in den Zusammenhang zwischen dem lokalen Entzündungszellinfiltrat und der IR-Expression als Indikator des Glukosebedarfs des Gewebes zu erhalten.

Der hohe Zellumsatz im Rahmen der Karzinogenese bedeutet auch bei Dysplasie und Karzinom einen hohen Glukosebedarf.⁷⁰ Bei 50% der Dysplasien war eine Heterogenität der IR-Expression zu beobachten. Auch bei dysplastischen Arealen könnte die heterogene IR-Expression auf lokal unterschiedlich rasches Zellwachstum und damit verbundenen Energiebedarf zurückzuführen sein. Außerdem sind auch über den IR-A vermittelte Effekte, welche Zellwachstum und -teilung induzieren vorstellbar und hierdurch eine Förderung der Entartung und Karzinomentstehung möglich.¹³⁵

Darüber hinaus ist das Gesamtbild des Insulin/IGF-Systems zu beachten, denn die intrazellulären Signalwege können durch verschiedene Rezeptoren vermittelt werden.⁴⁹ Es ist wahrscheinlich, dass innerhalb des Gewebes eine simultane Expression von IR, IGF-1R und Hybridrezeptoren vorhanden ist.⁶⁵ An den Stellen ohne IR-Nachweis könnten IGF-1R oder Hybridrezeptor die entsprechenden Effekte vermitteln, sodass in unseren immunhistochemischen Experimenten hier keine Färbung des IR auftrat.

Letztendlich könnte die Heterogenität außerdem mit dem Aktivierungszustand des IR einer Zelle zusammenhängen. Durch die Aktivierung des Rezeptors kommt es zu einer Internalisierung und einer entsprechenden intrazellulären Lokalisation.⁵¹ Bei Zellen mit membranständigem Nachweis sind hingegen überwiegend Rezeptoren ohne gebundenen Liganden transmembranär exprimiert.⁷¹ Die Zellen innerhalb des Zellverbandes könnten sich in verschiedenen Zuständen der Rezeptoraktivierung bzw. des Rezeptorrecyclings befinden, welches zu der Heterogenität der immunhistochemischen Färbung beitragen könnte.

Eine weitere Beobachtung war die kontinuierliche Zunahme der IR-Expression entlang der Krypte von basal nach luminal. In der Basis der Krypte liegen die multipotenten Stammzellen, welche zu Enterozyten ausdifferenzieren sowie auch zu den weiteren Zellen des Kolonepithels (Becherzellen, Panethzellen und endokrine Zellen).⁶² Während des Aufstiegs entlang der Krypte findet die Differenzierung der Zellen bis zur Oberfläche hin statt.¹⁴² Bei simultaner Zunahme der IR-Expression entlang der Krypte könnte der IR als Marker der Differenzierung angesehen werden. Für differenziertes Gewebe charakteristisch ist besonders der IR-B.¹⁴² Andres et al. zeigten die Zunahme der IR-B Expression in differenzierten Zellen im Vergleich zu epithelialen Stammzellen und die Hemmung der Proliferation durch die IR-B-Expression.^{87,143} Dabei scheint der IR-B entscheidend für die Aufrechterhaltung der normalen

Differenzierung der Zellen und für die Verhinderung der Entartung zu sein.¹⁴³ Diese Annahme ist mit unserer Beobachtung zu vereinbaren, dass der Kryptengradient vor allem bei gesundem Gewebe ausgeprägt war. Innerhalb der Kontrollgruppe war der Gradient bei 90% der Gewebeproben vorhanden. Vorstellbar wäre, dass der hohe Zellumsatz im Rahmen der Entzündung bei CU die Differenzierung der Enterozyten entlang der Krypte behindert, sodass es nicht zu der Ausdifferenzierung der Zellen mit entsprechender IR-Expression kommt. Bei malignen Tumoren ist der Verlust der Differenzierung der Zellen ein Merkmal der Karzinogenese.¹⁴³ Entsprechend war der Kryptengradient bei unserem Dysplasie- und Adenom-Gewebe nur bei 23% bzw. 30% der Proben zu beobachten. Bei unseren Proben kolorektaler Karzinome war ein Kryptengradient nicht vorhanden.

4.3. Rückschlüsse auf die Karzinogenese

4.3.1. Colitis ulcerosa und Karzinogenese des Colitis ulcerosa-assoziierten Karzinoms

Neben der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz entsteht ein Teil der kolorektalen Karzinome aufgrund der entzündlichen Vorgänge bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.¹⁴⁴ Speziell bei CU besteht ein erhöhtes Karzinomrisiko.^{25,32} Die chronische Entzündung erzeugt ständige Wachstums- und Regenerationsreize.³² Dies wirkt sich fördernd auf die Entstehung von Dysplasien als Präkanzerosen und letztendlich von Karzinomen aus.^{32,145} Um die Rolle des IR in diesen Ablauf einzuordnen, wurden Gewebeproben von Patienten mit Linksseitencolitis, Pancolitis, Dysplasien und cCRC untersucht.

Anhand unserer Ergebnisse ist ein Zusammenhang zwischen Entzündung und IR-Expression zu vermuten. Mit zunehmendem Entzündungsgrad war eine stärkere Expression des IR zu beobachten. Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit den Ergebnissen von Bjerrum et al.¹⁴⁵ Darüber hinaus konnte ich eine vaskuläre IR-Expression nachweisen, die ebenfalls mit dem Entzündungsgrad korrelierte.

Durch die Gewebeschädigung und ständige Bildung neuer Enterozyten als Ersatz der geschädigten Zellen ist der Energiebedarf der Zellen bei CU gesteigert.¹³⁹ Die Expression des IR könnte in entzündeter Mukosa hochreguliert sein, um über den Einbau von GLUT-Transportern zu einer vermehrten Glukoseaufnahme in die Zelle beizutragen.^{32,135} Darüber hinaus sind proliferative und anti-apoptotische Effekte zur Anregung des Zellwachstums bei

entzündlich bedingten Gewebeschäden über den IR und IGF-1-Rezeptor möglich.⁵¹ Dies kann einen entscheidenden Punkt der Entzündung-Dysplasie-Karzinom-Sequenz darstellen.

Vorstellbar ist außerdem die Entwicklung einer lokalen Insulinresistenz im Entzündungsmilieu der CU. Chronisch entzündliche Zustände sind auf systemischer Ebene mit der Entstehung von insulinresistenten Zellen assoziiert.^{70,130} Die systemische geringgradige Entzündung bei Adipositas ist ein Faktor bei der Entstehung einer peripheren Insulinresistenz.^{128,131} Proinflammatorische Zytokine bewirken die inhibitorische Phosphorylierung von IRS-1 mit einer beeinträchtigten Autophosphorylierung des IR als Folge.¹³⁰ Die dysregulierte Signalweiterleitung führt insgesamt zu dem Verlust der metabolischen Wirkweise über den IR.^{70,130} Es entsteht eine Verschiebung des IR-A/IR-B-Verhältnisses zugunsten des IR-A durch Herabregulation des IR-B bei insulinresistenten Zellen.⁵¹ Durch die Dominanz des IR-A kommt es zu der vermehrten Formation von IR-A/IGF-1R-Hybridrezeptoren.⁵¹ Dies trägt weiter zu der Insulinresistenz der Zellen bei, denn die Affinität der Hybride zu Insulin ist vermindert, sodass vorrangig IGFs gebunden und weniger Insulineffekte vermittelt werden.⁵¹

Auf lokaler Ebene könnten die proinflammatorischen Einflüsse der CU ein Übergewicht des IR-A in Enterozyten und in diesem Zusammenhang mitogene Signale sowie die Entstehung von Dysplasien ermöglichen. IR-A sowie IR-A/IGF-1R-Hybride wirken stark wachstumsstimulierend auf die Zellen.⁵¹ Sie sind hochaffine Rezeptoren für IGF-2 und Insulin, deren Bindung proliferative Signalkaskaden über ERK und MAP-Kinase aktiviert.^{49,88} Somit ist es möglich, dass die proinflammatorischen Zytokine direkt, aber auch über die Induktion der IR-A-Expression proliferative Reize vermitteln.⁶⁵

Im Widerspruch zu den Ergebnissen von Bjerrum et al. konnten wir keine stärkere IR-Expression innerhalb der Dysplasie im Vergleich zur Pancolitis feststellen.^{51,145} Auch im Vergleich zu den anderen Gruppen war keine signifikant erhöhte IR-Expression bei der Dysplasie nachweisbar. Einzig der Vergleich zu dem nicht-dysplastischen Umgebungsgewebe ergab eine signifikant höhere IR-Expression bei der Dysplasie. Dieser Unterschied anhand der HScore-Wertungen spiegelte allerdings nicht das mikroskopische Gesamtbild wider. Es bestand ein heterogenes Expressionsmuster des IR, sodass die Dysplasie nicht anhand der IR-Expression identifiziert werden konnte. Sowohl in dysplastischen als auch in nicht-dysplastischen Bereichen waren Epithelanteile mit starkem und schwachem IR-Nachweis vorhanden. Die Expression des IR stellt anhand der histologischen Bewertung somit keinen spezifischen Marker für Dysplasien dar.

Auch ohne IR-Überexpression in dem dysplastischen Gewebe ist die mitogene Stimulation über den IR möglich. Angesichts der entzündlichen Umgebung könnte eine Dysregulation der IR-Expression und Entstehung von insulinresistenten Zellen gefördert werden. Dann würde die

Herabregulation des IR-B zu einer reduzierten metabolischen Signaltransduktion führen, während vermehrt proliferative Effekte über die Dominanz von IR-A und IR/IGF-1R-Hybridrezeptoren vermittelt werden könnten.¹³⁹ Zu der Rolle des IGF-1R in dysplastischen Zellen bei CU ist bisher wenig bekannt und es werden weitere Studien benötigt um den IGF-1R in die Dysplasie-Karzinom-Sequenz einzuordnen. Das Zusammenspiel unterschiedlicher Rezeptoren könnte auch die Ursache der heterogenen IR-Expression sein. An Stellen ohne IR-Expression könnten stattdessen IGF-1R oder Hybridrezeptoren exprimiert werden, die jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit waren.

Zu beachten ist außerdem, dass die Bewertung der Dysplasie nicht unabhängig von der Entzündung möglich ist, da die CU-assoziierten Dysplasien im Rahmen der Entzündung entstehen. In der entzündeten Mukosa war unabhängig von der Dysplasie eine starke IR-Expression nachweisbar. Somit kann keine klare Trennung zwischen IR-Expression im Rahmen der Entzündung und möglicher IR-Überexpression dysplastischer Zellen gemacht werden. Zur weiteren Differenzierung der Wirkweise des IR wäre außerdem die Unterscheidung der IR-Isoformen notwendig.

Die cCRC zeigten eine mäßige bis stark ausgeprägte IR-Expression. Hinsichtlich der lokalen IGF-2 Produktion durch Tumorzellen scheint die Signaltransduktion durch IR-A und IR-A/IGF-1R-Hybride entscheidend für eine parakrine, onkogene Stimulation zu sein.⁵¹ Die Überexpression des IR-A und des IGF-1R auf Tumorzellen ist entscheidend für die mitogene Stimulation und Hemmung der Apoptose.^{65,88} Es ist vorstellbar, dass auch hier eine lokale Entzündung dies über die Beeinflussung der IR-Expression und IR-Signaltransduktion fördert und somit einen Teil der Karzinogenese darstellt.

4.3.2. Karzinogenese des sporadischen kolorektalen Karzinoms

Die immunhistochemische Färbung ergab bei den low-grade Adenomen membranständig eine sehr geringe Expression des IR. Dies unterschied das adenomatöse Gewebe von dem umgebenden Normalgewebe, bei dem eine deutliche membranäre IR-Expression nachweisbar war. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Abbruzzese et al. lag der IR in dem Adenomgewebe auch in unserer Studie fast ausschließlich zytoplasmatisch vor.^{41,138} Anzunehmen ist der aktivierte Zustand des IR mit endosomaler Lokalisation nach Internalisierung des Liganden-Rezeptor-Komplexes.¹³⁸ Es wäre entsprechend vorstellbar, dass

die Signalweiterleitung zu diesem frühen Zeitpunkt der Karzinogenese über den IR vermittelt wird. Eine IR-Überexpression bei low-grade Adenomen fand sich allerdings nicht.

Die grundsätzliche Beteiligung des Insulin/IGF-Systems in der Anfangsphase der Karzinomentstehung ist wahrscheinlich.^{51,130} Hohe IGF- und Insulinspiegel stehen nicht nur im Zusammenhang mit kolorektalen Karzinomen, sondern erhöhen bereits das Entstehungsrisiko kolorektaler Adenome.⁹⁰ So ist bei Patienten mit Akromegalie, einer Erkrankung mit erhöhten IGF-1-Spiegeln, das Risiko kolorektaler Adenome erhöht.⁵ Auch hohe IGF-1-Konzentrationen in Folge von Adipositas und Insulinresistenz scheinen die Entwicklung kolorektaler Adenome zu fördern.¹⁴⁶ Relevant könnte dabei nicht nur die Höhe, sondern die Dauer erhöhter systemischer IGF-Konzentrationen sein.⁵

Auch Hyperinsulinämie im Rahmen von Diabetes mellitus Typ 2 ist mit dem erhöhten Risiko kolorektaler Adenome assoziiert.¹⁴⁷ Die Hyperinsulinämie entsteht durch die Steigerung der pankreatischen Insulinproduktion, um die periphere Insulinresistenz zu kompensieren.⁵¹ Die Hyperinsulinämie scheint in der normalen Kolonmukosa eine Reduktion der Apoptoserate zu bewirken und so die Entwicklung von Adenomen zu begünstigen.⁴⁹ Santoro et al. fanden heraus, dass hohe Insulinspiegel das IR-A/IR-B-Verhältnis durch die verminderte Expression des IR-B verschieben.^{51,133} Dadurch überwiegen mitogene Signale des IR-A, was mit dem vermehrten Auftreten kolorektaler Adenome assoziiert ist.¹⁴⁸ Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass die verminderte Expression des IGF-1-Rezeptors durch hohe Insulinspiegel induziert wird.¹⁴⁸ Dies ist möglicherweise auf die insulinabhängige Steigerung des IGF-1-Spiegels zurückzuführen, wodurch es zu der Herabregulation des IGF-1R kommt.¹⁴⁸ Entsprechend assoziieren sie Insulin und die Signaltransduktion über den IR-A als hauptsächliche Risikofaktoren der Adenomentstehung und nicht den IGF-1R.¹⁴⁸

Bei low-grade Adenomen scheint die Verschiebung des IR-A/IR-B-Verhältnisses der erste Schritt in Richtung proliferativer Signalkaskaden zu sein, ohne dass es zunächst zu einer Überexpression des IR im Gesamten kommt.¹⁴⁸ Eine Überexpression des IR konnten wir entsprechend nicht nachweisen. Eine Heraufregulation der IR-A-Expression durch Insulin könnte die mitogene Signalweiterleitung über diese Isoform des IR begünstigen.⁵¹ Dies könnte zudem zu der vermehrten Bildung von IR-A/IGF-1R-Hybridrezeptoren führen, welche mit stark proliferativen Reizen assoziiert sind.⁵¹

Bei kolorektalen Karzinomen ist die Überexpression des IR-A, des IGF-1R und des IR-A/IGF-1R-Hybridrezeptors bekannt.^{131,149} Diese Rezeptoren sind hochaffin für Insulin und IGF-2 und vermitteln proliferative und anti-apoptotische Effekte.^{51,150} Für die Tumorzellen ist Insulin ein essentieller Wachstumsfaktor.⁴⁹ Die systemischen Insulinspiegel sind für die

Prognoseeinschätzung bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen, möglicherweise auch zum Screening oder zur Risikostratifizierung, besser geeignet als der IGF-1 oder IGF-2-Spiegel.⁴⁹ Dies ist auf die lokale Produktion der IGFs durch die Karzinomzellen zurückzuführen, sodass die systemische Erfassung der Spiegel nicht die Konzentration im Tumorgewebe widerspiegelt.⁹⁴ Allerdings scheint in Karzinomgewebe, im Gegensatz zu Adenomgewebe, der IGF-1R stärker exprimiert zu werden.⁹⁴ Dies lässt darauf schließen, dass mitogene und anti-apoptotische Signale im späteren Verlauf der Karzinogenese ebenfalls über den IGF-1R vermittelt werden, während anfangs der IR-A entscheidend sein könnte.

Mit Diabetes mellitus Typ 2 assoziierte Pathologien sind als weitere fördernde Einflüsse der Karzinogenese zu bedenken. Es wird angenommen, dass Hyperglykämien ebenfalls das Wachstum maligner Zellen fördern, da Glukose zur Deckung des Energiebedarfs der Zellproliferation benötigt wird.^{49,131,133} Zudem entstehen proinflammatorische und proliferative Effekte durch oxidativen Stress, welcher im Rahmen von Hyperglykämien durch die vermehrte Glycolysierung von Proteinen entsteht.¹³¹ Bei Adipositas wirken proliferative Mediatoren im Rahmen der geringgradigen chronischen Entzündung auf die Entwicklung von Tumoren.^{131,133} Dabei ist vorrangig ein vergrößerter Bauchumfang mit dem erhöhten Risiko kolorektaler Adenome assoziiert, möglicherweise aufgrund des direkten Effekts des viszeralen Fettgewebes auf die Adenomentstehung.^{5,131} Unsere Studie ist hinsichtlich der metabolischen Einflüsse auf die Karzinogenese limitiert, da unklar ist, welche Gewebeproben von Patienten mit Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 oder prädiabetischer Insulinresistenz stammen. Es war nicht möglich, Zusammenhänge von Hyperglykämie und Hyperinsulinämie mit dem Auftreten kolorektaler Adenome anhand unseres Kollektivs zu überprüfen.

4.3.3. Vaskuläre Insulinrezeptorexpression und lokale Entzündung

Wir konnten nachweisen, dass der IR nicht nur epithelial, sondern auch vaskulär exprimiert wird. Mit zunehmender Entzündung war die Zunahme einer vaskulären IR-Expression zu beobachten, mit stärkster vaskulärer IR-Expression bei der Pancolitis. Darüber hinaus war die vaskuläre IR-Expression bei den kolorektalen Karzinomen signifikant häufiger nachweisbar.

Anhand von in vitro-Studien scheint eine Beteiligung des IR an der Transzytose von Insulin bei Endothelzellen möglich zu sein.¹³⁰ So könnte zirkulierendes Insulin zu den Zielzellen, in diesem

Fall die Enterozyten, gelangen. Dies könnte eine Erklärung der vaskulären IR-Expression darstellen.

Andererseits sind direkte IR-Effekte auf Endothelzellen bekannt.⁵¹ Die vaskuläre IR-Aktivierung bewirkt eine Vasodilatation durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid über den PI3K-Akt-Signalweg.^{130,151} Außerdem ist die Beteiligung des Insulin/IGF-Systems mittels vaskulärer IR-Expression an der Angiogenese möglich.¹⁵¹ Durch Insulin wird die Zellmigration im Rahmen der Angiogenese über die PI3K-Akt-Signalkaskade stimuliert.¹⁵² Im mikrovaskulären Gefäßsystem konnten weitere Einflüsse von Insulin nachgewiesen werden, hier stimuliert Insulin die endotheliale Zellproliferation und Produktion der proangiogenen Mediatoren „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) und Angiogenin (Ang).¹⁵² Die Angiogenese ist ein wichtiger Prozess der Karzinogenese um die Versorgung des schnell wachsenden Tumorgewebes zu ermöglichen.¹⁵¹ Die vaskuläre IR-Überexpression bei Karzinomen könnte auf einen proangiogenen Effekt hindeuten. Dies stellt eine weitere Möglichkeit der onkogenen Wirkung des IR neben dem proliferativen Einfluss auf die Tumorzellen selbst durch die epitheliale IR-Expression dar. Über den vaskulären IR ist die Möglichkeit der Stimulation der Angiogenese unabhängig von VEGF in Prostatakarzinom-Xenografts beobachtet worden.¹⁵² Dabei scheinen proangiogene Effekte durch beide Isoformen vermittelt zu werden.^{51,153} Roudnicky et al. identifizierten die vaskuläre IR Expression im Rahmen von Blasenkarzinomen.⁵¹ Wir konnten in unserer Studie zeigen, dass der IR auch bei kolorektalen Karzinomen vaskulär exprimiert wird. Von daher besteht auch hier die Vermutung, dass durch den IR pro-angiogene Effekte vermittelt werden. Heckl et al. konnten in einer Nachfolgestudie zeigen, dass die vaskuläre IR-A-Expression im Zusammenhang mit fortgeschrittenen Stadien kolorektaler Karzinome steht.¹⁵⁴ Da in fortgeschrittenen Tumorstadien aufgrund des raschen Wachstums oft hypoxische Bedingungen herrschen, könnte die vaskuläre IR-Überexpression durch Hypoxie stimuliert sein.¹⁵⁰ So hatten Roudnicky et al. beispielsweise beim Blasenkarzinom einen Zusammenhang zwischen der vaskulären IR-Expression und dem Transkriptionsfaktor „Hypoxie-induzierter Faktor 1 α “ (HIF1 α) nachgewiesen.^{150,154} Es scheint außerdem ein Zusammenhang zwischen HIF1 α mit der GLUT-1-Aktivierung bei hypoxischen Zuständen zu bestehen, wobei die Rolle des IR bisher nicht vollständig geklärt ist.^{154,155}

Ein Zusammenhang zwischen IR-Expression und Angiogenese ist zudem auch bei Entzündung vorstellbar. Als Bestandteil der Entzündungsreaktion ist die Angiogenese wichtig, um die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen bei der Heilung und Reparatur zu gewährleisten.¹⁵⁶ Dies stellt eine mögliche Erklärung für die Zunahme der vaskulären IR-Expression mit Zunahme des Entzündungsausmaßes der Colitis ulcerosa dar. Es ist hypothetisch denkbar, dass das Entzündungsgeschehen bei Colitis ulcerosa eine lokale

Insulinresistenz im Bereich des entzündeten Areals induziert und hierdurch eine vermehrte lokale Insulinrezeptor IR-A-Expression bedingen könnte. Grundlage dieser Überlegung ist der Zusammenhang zwischen inflammatorischen Erkrankungen und der Entwicklung einer Insulinresistenz.^{128,132} Die systemische Insulinresistenz im Rahmen von Diabetes mellitus Typ 2 ist mit einer endothelialen Dysfunktion assoziiert und durch veränderte IR-Signaltransduktion an der Entstehung kardiovaskulärer wie auch neoplastischer Erkrankungen beteiligt.^{130,151}

Auch im Rahmen von Karzinomen besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen der vaskulären IR-Expression und inflammatorischen Einflüssen durch das Tumormicroenvironment (TME). Dieses Umgebungsgewebe der Tumorzellen ist typischerweise ein entzündliches Milieu mit diversen Immunzellen.¹⁵⁸ Das TME setzt sich aus Fibroblasten, Immunzellen und Zellen des monozytären Systems zusammen.¹⁵⁹ Durch die Produktion proinflammatorischer Mediatoren, wie TNF- α , IL-8 und IGF-1, wird die Entstehung und das Wachstum von Tumorzellen stimuliert.¹⁵⁹ Es ist hypothetisch denkbar, dass diese lokalen Entzündungsprozesse eine vaskuläre Überexpression von IR-A auslösen könnten und dadurch die Angiogenese des Tumors befördern könnten. Die lokale IGF-2-Produktion bei Karzinomen könnte dabei den Prozess verstärken, denn IGF-2 bindet im Allgemeinen präferentiell an den IR-A.⁴⁹ Zudem ist eine Assoziation von Insulinresistenz und Hyperinsulinämie mit Tumorangiogenese und -entwicklung bekannt.⁵¹

Entzündung und Insulinresistenz könnten entsprechend nicht nur epithelial, sondern auch vaskulär zu der IR-A-Überexpression beitragen und einen relevanten Einfluss auf die Angiogenese darstellen. Dies könnte im Rahmen von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie CU, aber auch bei Karzinomen, im Zusammenhang mit einem inflammatorischen TME eine Rolle spielen.

4.4. Fazit

Die IR-Expression in low-grade Adenomen und Dysplasien war nicht signifikant erhöht, sodass der IR keinen Marker der kolorektalen Karzinomvorstufen darstellt. Der IR scheint erst zu späteren Zeitpunkten der Karzinogenese auf den Zellen von sCRC wie auch cCRC überexprimiert zu werden. Insgesamt besteht der Verdacht, dass nicht nur die Expression des IR auf Tumorzellen, bzw. der Vorläuferzellen, die Karzinogenese fördert, sondern dass auch die vaskuläre IR-Expression über eine die Stimulation der Angiogenese beteiligt sein könnte.

Dabei könnten proinflammatorische Einflüsse sowohl die epitheliale als auch vaskuläre IR-Expression beeinflussen. Die Kenntnis der differenzierten Expression der Isoformen in diesen Zusammenhängen ist von Bedeutung und bedarf weiterer Studien.

5. Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten Karzinomen in Deutschland und stellt die zweithäufigste karzinombedingte Todesursache bei Männern und die dritthäufigste bei Frauen dar. In 70% der Fälle entsteht das kolorektale Karzinom sporadisch aus Adenomen aufgrund von Punktmutationen ohne bekannte Ursache. Lebensstil und Ernährung sowie daraus folgende Stoffwechselerkrankungen stellen entscheidende Einflussfaktoren dar. Ferner können kolorektale Karzinome im Rahmen der chronisch entzündlichen Darmerkrankung Colitis ulcerosa auf dem Boden der chronischen Entzündung entstehen.

Das weitreichende Netzwerk des Insulin/IGF-Systems nimmt Einfluss auf viele Prozesse im Körper. Der Insulinrezeptor, welcher in zwei Isoformen vorkommt, kann über die Isoform A mitogene und anti-apoptotische Effekte vermitteln. Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus und Adipositas führen zu Störungen des Insulin/IGF-Systems. Im Rahmen dieser Dysregulation können erhöhte IGF-1-Spiegel und die Überexpression der Isoform A des Insulinrezeptors mit Karzinomerkkrankungen, unter anderem dem kolorektalen Karzinom, assoziiert werden.

Das Ziel dieser Doktorarbeit war zu prüfen, inwiefern und zu welchem Zeitpunkt die Überexpression des Insulinrezeptors im Rahmen der Karzinogenese kolorektaler Karzinome relevant ist. Es wurden die Karzinomvorstufen Adenom und Dysplasie untersucht um Gemeinsamkeiten und Unterschiede hinsichtlich der Insulinrezeptorexpression bei der Entstehung von sporadischen und Colitis ulcerosa-assoziierten kolorektalen Karzinomen zu prüfen und diagnostische und therapeutische Ansätze zu ermöglichen. Nicht-dysplastisches Darmgewebe von Patienten mit Colitis ulcerosa, Colitis ulcerosa-assoziierte Karzinome und gesundes Darmgewebe wurden darüberhinaus untersucht.

An FFPE-Gewebeschnitten wurde eine immunhistochemische Färbung mit Nachweis des Insulinrezeptors durchgeführt. Hierfür wurde der verwendete Antikörper im Rahmen dieser Arbeit erstmalig für die Immunhistochemie etabliert. Die Auswertung der Färbung erfolgte unter Anwendung des Histoscores mit festgelegten Referenzen.

Die Insulinrezeptorexpression war sowohl in der Plasmamembran als auch in dem Zytoplasma von Enterozyten nachweisbar, wobei eine signifikante Korrelation zwischen Membran- und Zytoplasmafärbung bestand. Der Insulinrezeptor war insgesamt in den Karzinomvorstufen Adenom und Dysplasie epithelial nicht signifikant überexprimiert im Vergleich zu den anderen Studiengruppen. Es konnte allerdings eine Korrelation zwischen Insulinrezeptorexpression und Entzündungsmaß bei Colitis ulcerosa beobachtet werden. Neben der epithelialen Insulinrezeptorexpression war die vaskuläre Expression eine neue Beobachtung, die mit dem

Entzündungsausmaß korrelierte und ebenfalls bei den Colitis ulcerosa-assoziierten Karzinomen vorkam.

Der Insulinrezeptor als spezifischer Marker für Präkanzerosen des kolorektalen Karzinoms ließ sich nicht bestätigen. Es ist jedoch eine Verschiebung des IR-A/IR-B-Verhältnisses als erster Schritt in Richtung proliferativer Signalkaskaden denkbar ohne dass es zunächst zu einer Überexpression des Insulinrezeptors im Gesamten kommt. Das Ausmaß des lokalen Entzündungsgeschehens war mit der vaskulären Insulinrezeptorexpression assoziiert. Der relevante Zusammenhang zwischen Entzündung und Insulinrezeptorexpression könnte als Hinweis auf die proliferativen Effekte des Insulinrezeptors gedeutet werden. Die erstmalige Beschreibung der vaskulären Insulinrezeptorexpression im Zusammenhang mit Entzündung sowie kolorektalen Karzinomen stellt die Grundlage weiterführender Forschung dar. In Anbetracht der weltweit zunehmenden Inzidenz an metabolischen Erkrankungen, wie Diabetes mellitus Typ 2, und dem damit verbundenen Zustand der Hyperinsulinämie und geringgradigen Entzündung, sind die genauen Zusammenhänge zwischen Inflammation, Insulinrezeptorexpression und Karzinomentstehung von großer Bedeutung. Der mögliche Einfluss einer vaskulären Insulinrezeptorexpression auf die Angiogenese im Prozess der Karzinogenese ermöglicht weitere Ansatzpunkte bei Diagnostik und Therapie kolorektaler Karzinome und deren Vorstufen.

II. Literaturverzeichnis

1. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. 2016;274. doi:10.17886/rkipubl-2016-014
2. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe A. S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom Langversion. *AWMF Regist 021/007OL*, <http://www.leitlinienprogramm-Onkol>. 2019;1-328.
3. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Dieste AP, Cerrada E, Yoldi MJR. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(1). doi:10.3390/ijms18010197
4. Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer. *Lancet*. 2014;383(9927):1490-1502. doi:10.1016/S0140-6736(13)61649-9
5. Bardou M, Barkun AN, Martel M. Obesity and colorectal cancer. *Gut*. 2017;933-948. doi:10.1136/gutjnl-2013-304701
6. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, et al. Meta-analyses of Colorectal Cancer Risk Factors. *Cancer Causes Control*. 2013;24(6):1207-1222. doi:10.1007/s10552-013-0201-5.Meta-analyses
7. Moskal A, Norat T, Ferrari P, Riboli E. Alcohol intake and colorectal cancer risk: A dose – response meta-analysis of published cohort studies. *Int J Cancer*. 2006;(120):664–671. doi:10.1002/ijc.22299
8. Brosens LAA, Offerhaus GJA, Giardiello FM. Hereditary Colorectal Cancer: Genetics and Screening. *Surg Clin North Am*. 2015;95(5):1067-1080. doi:10.1016/j.suc.2015.05.004.Hereditary
9. Stoffel E, Mukherjee B, Raymond VM, et al. Calculation of Risk of Colorectal and Endometrial Cancer Among Patients with Lynch Syndrome. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1621-1627. doi:10.1053/j.gastro.2009.07.039.Calculation
10. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, et al. Mutations of Chromosome 5q21 Genes in FAP and Colorectal Cancer Patients. *Science (80-)*. 1991;1-6.
11. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*. 2010;(138):2044–2058. doi:10.1053/j.gastro.2010.01.054
12. Fearon EF, Vogelstein B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell*. 1989;61(1):759-767.
13. Lin SH, Raju GS, Huff C, et al. The somatic mutation landscape of premalignant colorectal adenoma. *Gut*. 2018;67(7):1299-1305. doi:10.1136/gutjnl-2016-313573
14. Raskov H, Pommergaard HC, Burchardt J, Rosenberg J. Colorectal carcinogenesis-update and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014;20(48):18151-18164. doi:10.3748/wjg.v20.i48.18151
15. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic Alterations during Colorectal-Tumor Development. *N Engl J Med*. 1988;5126-5128. doi:10.1056/nejm198809013190901
16. Xie J, Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008;14(3):378-389. doi:10.3748/wjg.14.378
17. Yamane L, Scapulatempo-Neto C, Reis RM, Guimarães DP. Serrated pathway in colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(10):2634-2640. doi:10.3748/wjg.v20.i10.2634
18. Leggett B, Whitehall V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2088-2100. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.066
19. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, et al. Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline From the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology*. 2008;134(5):1570-1595. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.002
20. Brenner H, Hoffmeister M, Stegmaier C, Brenner G, Altenhofen L, Haug U. Risk of progression of advanced adenomas to colorectal cancer by age and sex: Estimates based on 840,149 screening colonoscopies. *Gut*. 2007;56:1585–1589. doi:10.1007/s10350-008-9210-y
21. Kim NH, Jung YS, Jeong WS, et al. Miss rate of colorectal neoplastic polyps and risk factors for missed polyps in consecutive colonoscopies. *Intest Res*. 2017;15(3):411-418. doi:10.5217/ir.2017.15.3.411
22. Dignass A, Eliakim R, Magro F, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part 1: Definitions and diagnosis. *J Crohn's Colitis*. 2012;6(10):965-990. doi:10.1016/j.crohns.2012.09.003
23. Conrad K, Roggenbuck D, Laass MW. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):463-466. doi:10.1016/j.autrev.2014.01.028
24. Dignass A, Preiss JC, Aust DE, et al. [Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis, 2011]. *Z Gastroenterol*. 2011;49(9):1276-1341. doi:10.1055/s-0031-1281666
25. Kucharzik T, Dignass AU, Atreya R, et al. Aktualisierte S3-Leitlinie Colitis ulcerosa - Living Guideline: August 2020 - AWMF-Registriernummer: 021-009. *Z Gastroenterol*. 2020;58(12):E241-E326. doi:10.1055/a-1296-3444
26. Sartor RB, Wu GD. Roles for Intestinal Bacteria, Viruses, and Fungi in Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases and Therapeutic Approaches. *Gastroenterology*. 2017;20(10):1878-1891. doi:10.1162/jocn.2008.20125.Left-lateralized
27. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*. 2005;19 Suppl A(September):5A-36A.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151544>.
28. Christensen B, Hanauer SB, Erlich J, et al. Histologic Normalization Occurs in Ulcerative Colitis and Is Associated With Improved Clinical Outcomes. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017. doi:10.1016/j.cgh.2017.02.016
 29. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001;48(4):526-535. doi:10.1136/gut.48.4.526
 30. Lakatos P-L. Risk for colorectal cancer in ulcerative colitis: Changes, causes and management strategies. *World J Gastroenterol*. 2008;14(25):3937. doi:10.3748/wjg.14.3937
 31. Rogler G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer. *Cancer Lett*. 2014;345(2):235-241. doi:10.1016/j.canlet.2013.07.032
 32. Romano M, De Francesco F, Zarantonello L, et al. From inflammation to cancer in inflammatory bowel disease: Molecular perspectives. *Anticancer Res*. 2016;36(4):1447-1460.
 33. Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: Colitis-associated neoplasia. *Semin Immunopathol*. 2013;35(2):229-244. doi:10.1007/s00281-012-0352-6
 34. Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*. 2011;140(6):1807-1816. doi:10.1053/j.gastro.2011.01.057
 35. Humphries A, Jawad N, Ignjatovic A, East J, Leedham S. *Carcinogenesis in Ulcerative Colitis*; 2012. doi:10.5772/711
 36. Kobayashi K, Tomita H, Shimizu M, et al. p53 Expression as a Diagnostic Biomarker in Ulcerative Colitis-Associated Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1284. doi:10.3390/ijms18061284
 37. Brentnall TA, Crispin DA, Rabinovitch P, et al. Mutations in the ~ 53 Gene: An Early Marker of Neoplastic Progression in Ulcerative Colitis. 1994:369-378.
 38. Hoque ATMS, Hahn SA, Schutte M, Kern SE. DPC4 gene mutation in colitis associated neoplasia. *Gut*. 1997;(May 1996):120-122.
 39. Aust DE, Willenbacher RF, Terdiman JP, et al. Chromosomal alterations in ulcerative colitis-related and sporadic colorectal cancers by comparative genomic hybridization. *Hum Pathol*. 2000;31(1):109-114. doi:10.1016/S0046-8177(00)80206-3
 40. Redston M, Papadopoulos N, Caldas C, Kinzler K, Kern S. Common Occurrence of APC and K-ras Gene Mutations in the Spectrum of Colitis-Associated Neoplasias. *Gastroenterology*. 1995:383-392.
 41. Baretton GB, Aust DE. Intraepitheliale Neoplasie/Dysplasie – Diagnose bei Colitis ulcerosa. *Pathologe*. 2008;29(S2):280-285. doi:10.1007/s00292-008-1057-4
 42. Thomas T, Abrams KA, Robinson RJ, Mayberry JF. Meta-analysis: Cancer risk of low-grade dysplasia in chronic ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;25(6):657-668. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03241.x
 43. Laine L, Kaltenbach T, Barkun A, McQuaid KR, Subramanian V, Soetikno R. SCENIC international consensus statement on surveillance and management of dysplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2015;148(3):639-651.e28. doi:10.1053/j.gastro.2015.01.031
 44. Paris Workshop Participants. The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon. *Gastrointest Endosc*. 2003;58(6):S3-S43.
 45. Bonovas S, Fiorino G, Lytras T, Nikolopoulos G, Peyrin-Biroulet L, Danese S. Systematic review with meta-analysis: use of 5-aminosalicylates and risk of colorectal neoplasia in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;45(9):1179-1192. doi:10.1111/apt.14023
 46. Velayos FS, Terdiman JP, Walsh JM. Effect of 5-aminosalicylate use on colorectal cancer and dysplasia risk: A systematic review and metaanalysis of observational studies. *Am J Gastroenterol*. 2005;100(6):1345-1353. doi:10.1111/j.1572-0241.2005.41442.x
 47. Korelitz BI, Sultan K, Kothari M, Arapos L, Schneider J, Panagopoulos G. Histological healing favors lower risk of colon carcinoma in extensive ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(17):4980-4986. doi:10.3748/wjg.v20.i17.4980
 48. Ojha A, Ojha U, Mohammed R, Chandrashekar A, Ojha H. Current perspective on the role of insulin and glucagon in the pathogenesis and treatment of type 2 diabetes mellitus. *Clin Pharmacol Adv Appl*. 2019;Volume 11:57-65. doi:10.2147/cpaa.s202614
 49. Vigneri R, Frittitta IDGL. Insulin, insulin receptors, and cancer. *J Endocrinol Invest*. 2016;39(12):1365-1376. doi:10.1007/s40618-016-0508-7
 50. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(2):85-96. doi:10.1038/nrm1837
 51. Belfiore A, Malaguarnera R, Vella V, et al. Insulin receptor isoforms in physiology and disease: An updated view. *Endocr Rev*. 2017;38(5):1-84. doi:10.1210/er.2017-00073
 52. Owerbach D, Bell GI, Rutter WJ, Shows TB. The insulin gene is located on chromosome 11 in humans. *Nature*. 1980;286:82-84.
 53. Chan SJ, Keim P, Steiner DF. Cell-free synthesis of rat preproinsulins: characterization and partial amino acid sequence determination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(6):1964-1968. doi:10.1073/pnas.73.6.1964
 54. Steiner DF, Chan SJ, Welsh M, Kwoe SCM. Structure and Evolution of the Insulin Gene. *Ann Rev Genet*. 1985;19(10):463-84.
 55. Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev*. 2013;9(1):25-53. doi:10.2174/157339913804143225
 56. Hou JC, Min L, Pessin JE. Insulin Granule Biogenesis, Trafficking and Exocytosis. *Vitam Horm*. 2009;80:473-

506. doi:10.1016/S0083-6729(08)00616-X. Insulin
57. Blundell TL, Cutfield JF, Cutfield SM, et al. Atomic positions in rhombohedral 2-zinc insulin crystals. *Nature*. 1971;231(5304):506-511. doi:10.1038/231506a0
58. Ullrich A, Bell JR, Chen EY, et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*. 1985;313(6005):756-761. doi:10.1038/313756a0
59. Kasuga M, Karlsson FA, Kahn CR. Insulin Stimulates the Phosphorylation of the 95,000-Dalton Subunit of Its Own Receptor. *Science* (80-). 1981;215:4-7.
60. Massague J, Pilch PF, Czech MP. Electrophoretic resolution of three major insulin receptor structures with unique subunit stoichiometries. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(12):7137-7141. doi:10.1073/pnas.77.12.7137
61. Sparrow LG, McKern NM, Gorman JJ, et al. The disulfide bonds in the C-terminal domains of the human insulin receptor ectodomain. *J Biol Chem*. 1997;272(47):29460-29467. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9368005.
62. Tatulian SA. Structural Dynamics of Insulin Receptor and Transmembrane Signaling. *Biochemistry*. 2015;54(36):5523-5532. doi:10.1021/acs.biochem.5b00805
63. Schäffer L. A model for insulin binding to the insulin receptor. *Eur J Biochem*. 1994;221:1127-1132.
64. De Meyts P. The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? *Trends Biochem Sci*. 2008;33(8):376-384. doi:10.1016/j.tibs.2008.06.003
65. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin Receptor Isoforms and Insulin Receptor / Insulin-Like Growth Factor Receptor Hybrids in Physiology and Disease. 2015;30(July):586-623. doi:10.1210/er.2008-0047
66. Hubbard SR. Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog. *EMBO J*. 1997;16(18):5572-5581. doi:10.1093/emboj/16.18.5572
67. Li S, Covino ND, Stein EG, Till JH, Hubbard SR. Structural and biochemical evidence for an autoinhibitory role for tyrosine 984 in the juxtamembrane region of the insulin receptor. *J Biol Chem*. 2003;278(28):26007-26014. doi:10.1074/jbc.M302425200
68. Kiselyov V V, Verstehey S, Gauguin L, De Meyts P. Harmonic oscillator model of the insulin and IGF1 receptors' allosteric binding and activation. *Mol Syst Biol*. 2009;5(243):1-12. doi:10.1038/msb.2008.78
69. Siddle K. Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: Neglected corners and recent advances. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3(FEB):1-24. doi:10.3389/fendo.2012.00034
70. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014. 2014;6:a009191. doi:10.1101/cshperspect.a009191
71. Siddle K. Signalling by insulin and IGF receptors: Supporting acts and new players. *J Mol Endocrinol*. 2011;47(1). doi:10.1530/JME-11-0022
72. Sakamoto K, Holman GD. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(1):E29-37. doi:10.1152/ajpendo.90331.2008
73. Belfiore A, Malaguarnera R. Insulin receptor and cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18(4):125-147. doi:10.1530/ERC-11-0074
74. Düvel K, Yecies JL, Menon S, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mtor complex 1. *MolCell*. 2010;39(2):171-183. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.022. Activation
75. Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev*. 2009;30(6):586-623. doi:10.1210/er.2008-0047
76. Malaguarnera R, Belfiore A. The insulin receptor: A new target for cancer therapy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2011;2(DEC):1-16. doi:10.3389/fendo.2011.00093
77. Frasca F, Pandini G, Sciacca L, et al. The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. *Arch Physiol Biochem*. 2008;114(1):23-37. doi:10.1080/13813450801969715
78. Gorden P, Carpentier J, Freychet P, LeCam A, Orci L. Intracellular translocation of iodine-125-labeled insulin: direct demonstration in isolated hepatocytes. 1978.
79. Kay DG. Selective Degradation of Insulin within Rat Liver Endosomes. 1990;1(January):35-42.
80. Posner BI. Insulin Signalling: The Inside Story Endothelium of Brain Microvessels. *Can J Diabetes*. 2017;41(1):108-113. doi:10.1016/j.jcjd.2016.07.002
81. Authier F, Tioui MM, Fabrega S, Kouach M, Briand G. Endosomal proteolysis of internalized insulin at the C-terminal region of the B chain by cathepsin D. *J Biol Chem*. 2002;277(11):9437-9446. doi:10.1074/jbc.M110188200
82. Yang-Feng T, Francke U, Ullrich A. Gene for human insulin receptor: localization to site on chromosome 19 involved in pre-B-cell leukemia. 1984;228(19).
83. Seino S, Seino M, Nishi S, Bell GI. Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(1):114-118. doi:10.1073/pnas.86.1.114
84. Ebina Y, Ellis L, Jarnagin K, et al. The human insulin receptor cDNA: The structural basis for hormone-activated transmembrane signalling. *Cell*. 1985;40(4):747-758. doi:10.1016/0092-8674(85)90334-4
85. Mosthaf L, Grako K, Dull TJ, Coussens L, Ullrich A, McClain DA. Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J*. 1990;9(8):2409-2413. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=552265&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

86. Moller D, Yokota A, Caro J, Flier J. Tissue-specific expression of two alternatively spliced insulin receptor mRNAs in man. *Mol Endocrinol.* 1989;3(8):1263-1269.
87. Sciacca L, Prisco M, Wu AN, et al. Signaling Differences from the A and B Isoforms of the Insulin Receptor (IR) in 32D Cells in the Presence or Absence of IR Substrate-1. 2003;144(6):2650-2658. doi:10.1210/en.2002-0136
88. Frasca F, Pandini G, Scalia P, et al. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol Cell Biol.* 1999;19(5):3278-3288. doi:10.1128/MCB.19.5.3278
89. Wu A, Sciacca L, Baserga R. Nuclear translocation of insulin receptor substrate-1 by the insulin receptor in mouse embryo fibroblasts. *J Cell Physiol.* 2003;195(3):453-460. doi:10.1002/jcp.10261
90. Vigneri PG, Tirrò E, Pennisi MS, et al. The Insulin/IGF System in Colorectal Cancer Development and Resistance to Therapy. *Front Oncol.* 2015;5(October):230. doi:10.3389/fonc.2015.00230
91. Louvi A, Accili D, Efstratiadis A. Growth-promoting interaction of IGF-II with the insulin receptor during mouse embryonic development. *Dev Biol.* 1997;189(1):33-48. doi:10.1006/dbio.1997.8666
92. Malaguarnera R, Sacco A, Voci C, Pandini G, Vigneri R, Belfiore A. Proinsulin Binds with High Affinity the Insulin Receptor Isoform A and Predominantly Activates the Mitogenic Pathway. 2012;153(May):2152-2163. doi:10.1210/en.2011-1843
93. Perks CM, Zielinska HA, Wang J, Jarrett C, Frankow A. Insulin Receptor Isoform Variations in Prostate Cancer Cells. 2016;7(September):1-15. doi:10.3389/fendo.2016.00132
94. Bowers LW, Rossi EL, O'Flanagan CH, De Graffenried LA, Hursting SD. The role of the insulin/IGF system in cancer: Lessons learned from clinical trials and the energy balance-cancer link. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015;6(MAY):1-16. doi:10.3389/fendo.2015.00077
95. Rinderknecht E, Humbel RE. Amino-terminal sequences of two polypeptides from human serum with nonsuppressible insulin-like and cell-growth-promoting activities: evidence for structural homology with insulin B chain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976;73(12):4379-4381. doi:10.1073/pnas.73.12.4379
96. Annunziata M, Granata R, Ghigo E. The IGF system. *Acta Diabetol.* 2011;48(1):1-9. doi:10.1007/s00592-010-0227-z
97. Ullrich A, Gray A, Tam AW, et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J.* 1986;5(10):2503-2512. doi:10.1111/j.1464-410X.2010.10017.x
98. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem.* 1978;253(8):2769-2776.
99. Fürstenberger G, Senn H-J. Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol.* 2002;3(5):298-302. doi:10.1016/S1473-3099(02)00159-9
100. Baxter RC, Martin JL. Binding proteins for the insulin-like growth factors: Structure, regulation and function. *Prog Growth Factor Res.* 1989;1(1):49-68. doi:10.1016/0955-2235(89)90041-0
101. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld R. The Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein. *Endocr Rev.* 1999;20(6):761-787. doi:http://dx.doi.org/10.1210/edrv.20.6.0382#sthash.HrWLTcx6.dpuf
102. Rotwein P. Structure , Evolution , Expression and Regulation of Insulin-Like Growth Factors I and II Mini-Review Structure , Evolution , Expression and Regulation of Insulin-Like Growth Factors I and II. 1991;7194(June):2-18. doi:10.3109/08977199109000267
103. LeRoith D, Yakar S. Mechanisms of Disease: metabolic effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007;3(3):302-310. doi:10.1038/ncpendmet0427
104. Clemmons DR. Role of IGF-I in skeletal muscle mass maintenance. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(7):349-356. doi:10.1016/j.tem.2009.04.002
105. Wang Y, Bikle DD, Chang W. Autocrine and Paracrine Actions of IGF-I Signaling in Skeletal Development. *Bone Res.* 2013;1(3):249-259. doi:10.4248/BR201303003
106. Werner H, Sarfstein R, LeRoith D, Bruchim I. Insulin-like Growth Factor 1 Signaling Axis Meets p53 Genome Protection Pathways. *Front Oncol.* 2016;6(June):1-13. doi:10.3389/fonc.2016.00159
107. LeRoith D, Roberts CT. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett.* 2003;195(2):127-137. doi:10.1016/S0304-3835(03)00159-9
108. Yuen K, Frystyk JAN, Umpleby M, et al. Changes in Free Rather Than Total Insulin-Like Growth Factor-I Enhance Insulin Sensitivity and Suppress Endogenous Peak Growth Hormone (GH) Release Young Healthy Adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(8):3956-3964. doi:10.1210/jc.2004-0300
109. DeChiara T, Efstratiadis A, Robertson E. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *J Colloid Interface Sci.* 1990;374(18):685-689. doi:10.1016/0021-9797(80)90501-9
110. Moschos SJ, Mantzoros CS. The role of the IGF system in cancer: From basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology.* 2002;63(4):317-332. doi:10.1159/000066230
111. Giannoukakis N, Deal C, Paquette J, Goodyer C, Polychronakos C. Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene. *Nat Genet.* 1993;3:73-96. doi:10.1038/ng0293-165
112. Massague J, Czech MP. The Subunit Structures of Two Distinct Receptors for Insulin-like Growth Factors I and II and Their Relationship to the Insulin Receptor. *J Biol Chem.* 1982;257(9):5038-5045.
113. Morrión A, Valentinis B, Xu SQ, et al. Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(8):3777-3782.
114. Werner H, Weinstein D, Bentov I. Similarities and differences between insulin and IGF-I: Structures , receptors

- , and signalling pathways. 2008;3455(June). doi:10.1080/13813450801900694
115. Furlanetto RW, Dey BR, Lopaczynski W, Nissley SP. 14-3-3 Proteins interact with the insulin-like growth factor receptor but not the insulin receptor. 1997;771:765-771.
116. Beitner-Johnson, LeRoith D. Insulin-like Growth Factor-I Stimulates Tyrosine Phosphorylation of Endogenous c-Crk. 1995;51875190.
117. Soos MA, Siddle K. Immunological relationships between receptors for insulin and insulin-like growth factor I. Evidence for structural heterogeneity of insulin-like growth factor I receptors involving hybrids with insulin receptors. *Biochem J*. 1989;263(2):553-563.
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2480779.
118. Bailyes EM, Navé BT, Soos MA, Orr SR, Hayward AC, Siddle K. Insulin receptor/IGF-I receptor hybrids are widely distributed in mammalian tissues: quantification of individual receptor species by selective immunoprecipitation and immunoblotting. *Biochem J*. 1997;327 (Pt 1:209-215. doi:10.1042/bj3270209
119. Sciacca L, Le Moli R, Vigneri R. Insulin analogs and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3(FEB). doi:10.3389/fendo.2012.00021
120. Zhang B, Roths RA. The Insulin Receptor-related Receptor. 1992;267(26):18320-18328.
121. Petrenko AG, Zozulya SA, Deyev IE, Eladari D. Insulin receptor-related receptor as an extracellular pH sensor involved in the regulation of acid-base balance. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics*. 2013;1834(10):2170-2175. doi:10.1016/j.bbapap.2012.11.011
122. Lawrence MC, McKern NM, Ward CW. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor. *Curr Opin Struct Biol*. 2007;17(6):699-705. doi:10.1016/j.sbi.2007.07.007
123. Nair P, Kamra A, Kessie G, et al. Insulin receptor-related receptor as an extracellular alkali sensor. *J Gastrointest Dig Syst*. 2012;8(1):1-6. doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012. Investigations
124. Nef S, Verma-Kurvari S, Merenmies J, et al. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. *Nature*. 2003;426(6964):291-295. doi:10.1038/nature02059
125. Ludwig T, Le Borgne R, Hoflack B. Roles for mannose-6-phosphate receptors in lysosomal enzyme sorting, IGF-II binding and clathrin-coat assembly. *Trends Cell Biol*. 1995;5(5):202-206. doi:10.1016/0962-8924(95)80012-6
126. Kornfeld S. Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem*. 1992;61:307-330. doi:10.1146/annurev.biochem.61.1.307
127. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas; 8th edn. *Brussels, Belgium Int Diabetes Fed*
<http://www.diabetesatlas.org>. 2017:1-150. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31679-8.
128. Keane KN, Cruzat VF, Carlessi R, De Bittencourt PIH, Newsholme P. Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/181643
129. Micucci C, Valli D, Matacchione G, Catalano A. Current perspectives between metabolic syndrome and cancer. *Oncotarget*. 2016;7(25). doi:10.18632/oncotarget.8341
130. Haeusler RA, McGraw TE, Accili D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat Publ Gr*. 2017;19(1):1-14. doi:10.1038/nrm.2017.89
131. Gallagher EJ, LeRoith D. Obesity and Diabetes: The Increased Risk of Cancer and Cancer-Related Mortality. *Physiol Rev*. 2015;95(3):727-748. doi:10.1152/physrev.00030.2014
132. Lee B-C, Lee J. Cellular and Molecular Players in Adipose Tissue Inflammation in the Development of Obesity-induced Insulin Resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2014;40(6):1301-1315. doi:10.1007/s10439-011-0452-9.Engineering
133. Keku TO, Lund PK, Galanko J, Simmons JG, Woosley JT, Sandler RS. Insulin resistance, apoptosis, and colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(9):2076-2081. doi:10.1158/1055-9965.EPI-05-0239
134. Cohen DH, LeRoith D. Obesity, type 2 diabetes, and cancer: The insulin and IGF connection. *Endocr Relat Cancer*. 2012;19(5):27-45. doi:10.1530/ERC-11-0374
135. Matthew G. Vander Heiden, Lewis C. Cantley, Craig B. Thompson. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (80-)*. 2009;324(may):1029-1033. doi:10.1126/science.1160809. Understanding
136. Samani AA, Yakar S, LeRoith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: Overview and recent insights. *Endocr Rev*. 2007;28(1):20-47. doi:10.1210/er.2006-0001
137. Hanyu Chen, Xiaobin Zheng, Xiaoyu Zong, Zitong Li, Na Li, Jinhee Hur, Cassandra DI Fritz, William Chapman Jr, Katelin B Nickel, Andrew Tipping, Graham A Colditz, Edward L Giovannucci, Margaret A Olsen, Ryan C Fields YC. Metabolic syndrome, metabolic comorbid conditions and risk of early-onset colorectal cancer. *Gut*. 2020;321661(doi: 10.1136).
138. Abbruzzese C, Diodoro MG, Sperduti I, et al. Detection of phosphorylated insulin receptor in colorectal adenoma and adenocarcinoma: Implications for prognosis and clinical outcome. *J Cell Physiol*. 2015;230(3):562-567. doi:10.1002/jcp.24733
139. Bjerrum JT, Nielsen OH, Riis LB, et al. Transcriptional analysis of left-sided colitis, pancolitis, and ulcerative colitis-associated dysplasia. *Inflamm Bowel Dis*. 2014;20(12):2340-2352. doi:10.1097/MIB.0000000000000235
140. Helander HF, Fändriks L. Surface area of the digestive tract-revisited. *Scand J Gastroenterol*. 2014;49(6):681-689. doi:10.3109/00365521.2014.898326

141. Morcavallo A, Genua M, Palummo A, et al. Insulin and insulin-like growth factor II differentially regulate endocytic sorting and stability of insulin receptor isoform A. *J Biol Chem.* 2012;287(14):11422-11436. doi:10.1074/jbc.M111.252478
142. Humphries A, Wright NA. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(6):415-424. doi:10.1038/nrc2392
143. Andres SF, Simmons JG, Mah AT, Santoro MA, Van Landeghem L, Lund PK. Insulin receptor isoform switching in intestinal stem cells, progenitors, differentiated lineages and tumors: evidence that IR-B limits proliferation. *J Cell Sci.* 2013;126(Pt 24):5645-5656. doi:10.1242/jcs.132985
144. Han L, Zhang G-F, Cheng Y-H, Zhao Q-C. Correlations of insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor I receptor with the clinicopathological features and prognosis of patients with colon cancer. *Jpn J Clin Oncol.* 2016;46(August):1127-1134. doi:10.1093/jjco/hyw137
145. Kraus S, Arber N. Inflammation and colorectal cancer. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(4):405-410. doi:10.1016/j.coph.2009.06.006.
146. Abreu A, Tovar AP, Castellanos R, et al. Challenges in the diagnosis and management of acromegaly: a focus on comorbidities. *Pituitary.* 2016;19(4):448-457. doi:10.1007/s11102-016-0725-2
147. Soubry A, Il'yasova D, Sedjo R, et al. Increase in Circulating Levels of IGF-1 and IGF-1/IGFBP-3 Molar Ratio over a Decade is Associated with Colorectal Adenomatous Polyps. *Int J Cancer.* 2012;131(2):512-517. doi:10.1371/journal.pone.0178059
148. Santoro MA, Andres SF, Galanko JA, Sandler RS, Keku TO, Lund PK. Reduced insulin-like growth factor 1 receptor and altered insulin receptor isoform mRNAs in normal mucosa predict colorectal adenoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(1):1-23. doi:10.1088/1367-2630/15/1/015008.Fluid
149. Trabulo D, Ribeiro S, Martins C, et al. Metabolic syndrome and colorectal neoplasms: An ominous association. *World J Gastroenterol.* 2015;21(17):5320-5327. doi:10.3748/wjg.v21.i17.5320
150. Heckl SM, Pellinghaus M, Krüger S, et al. Biomarker of prognostic relevance – insulin receptor expression in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2018;9(101):37497-37508.
151. Manrique C, Lastra G, Sowers JR. New insights into insulin action and resistance in the vasculature. *Ann N Y Acad Sci.* 2015;1311(1):138-150. doi:10.1038/jid.2014.371
152. Escudero CA, Herlitz K, Troncoso F, et al. Pro-angiogenic role of insulin: From physiology to pathology. *Front Physiol.* 2017;8(APR):1-14. doi:10.3389/fphys.2017.00204
153. Heidegger I, Kern J, Ofer P, Klocker H, Massoner P. Oncogenic functions of IGF1R and INSR in prostate cancer include enhanced tumor growth, cell migration and angiogenesis. *Oncotarget.* 2014;5(9). doi:10.18632/oncotarget.1884
154. Roudnicky F, Dieterich LC, Poyet C, et al. High expression of insulin receptor on tumour-associated blood vessels in invasive bladder cancer predicts poor overall and progression-free survival. *J Pathol.* 2017;242(2):193-205. doi:10.1002/path.4892
155. Heckl SM, Pellinghaus M, Krüger S, et al. Epithelial insulin receptor expression – prognostic relevance in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2018;9(101):37497-37508.
156. Petracco RG, Kong A, Grechukhina O, Krikun G, Taylor HS. Global gene expression profiling of proliferative phase endometrium reveals distinct functional subdivisions. *Reprod Sci.* 2012;19(10):1138-1145. doi:10.1177/1933719112443877
157. Liu Y, Petreaca M, Martins-Green M. Cell and molecular mechanisms of insulin-induced angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2009;13(11-12):4492-4504. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00555.x
158. Andrejeva G, Rathmell JC. Similarities and Distinctions of Cancer and Immune Metabolism in Inflammation and Tumors. *Cell Metab.* 2017;26(1):49-70. doi:110.1016/j.bbi.2017.04.008
159. Tabuso M, Homer-Vanniasinkam S, Adya R, Arasaradnam RP. Role of tissue microenvironment resident adipocytes in colon cancer. *World J Gastroenterol.* 2017;23(32):5829-5835. doi:10.3748/wjg.v23.i32.5829

III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1.	Die Adenom-Karzinom-Sequenz	5
Abbildung 1.2.	Die Dysplasie-Karzinom-Sequenz	11
Abbildung 1.3.	Die Pariser Klassifikation	12
Abbildung 1.4.	Der Insulinrezeptor	16
Abbildung 1.5.	Die Signalkaskaden des Insulinrezeptors	17
Abbildung 1.6.	Die Isoformen des Insulinrezeptors	20
Abbildung 1.7.	Die Liganden und Rezeptoren des Insulin/IGF-Systems	24
Abbildung 1.8.	Die Entwicklung der Prävalenz des Diabetes mellitus weltweit	25
Abbildung 2.1.	Die immunhistochemischen Färbungen zur Etablierung im Vergleich	38
Abbildung 2.2.	Die Referenzen für die Beurteilung der membranständigen Färbung	40
Abbildung 2.3.	Die Referenzen für die Beurteilung der zytoplasmatischen Färbung	40
Abbildung 3.1.	Die Heterogenität der insulinrezeptorexpression innerhalb einer Gewebeprobe	43
Abbildung 3.2.	Darstellung der membranständigen und zytoplasmatischen Histoscore-Verteilung des Gesamtkollektivs	44
Abbildung 3.3.	Korrelation zwischen der Membran- und Zytoplasmafärbung	46
Abbildung 3.4.	Die apikale Betonung der Membranfärbung	46
Abbildung 3.5.	Der Kryptengradient	47
Abbildung 3.6.	Verteilung der Histoscore Werte der membranständigen und zytoplasmatischen IR-Expression in der Dysplasie und in dem Umgebungsgewebe der Dysplasie	49
Abbildung 3.7.	Die Verteilung der IR-Expression in dysplastischem und nicht-dysplastischem Gewebe	49
Abbildung 3.8.	Die Endothelfärbung bei der Pancolitis	51
Abbildung 3.9.	Die Insulinrezeptorexpression bei Colitis ulcerosa-assoziierten Adenokarzinomen	52
Abbildung 3.10.	Die vaskuläre IR-Expression eines Colitis ulcerosa-assoziierten Adenomkarzinoms	52
Abbildung 3.11.	Verteilung der IR-Expression der kolorektalen Adenome und des nicht-adenomatösen Gewebes im Vergleich	53
Abbildung 3.12.	Graphische Darstellung der Histoscore-Werte der membranständigen und zytoplasmatischen IR-Expression in Adenom und Umgebungsgewebe	54
Abbildung 3.13.	Epitheliale Insulinrezeptorexpression bei der Kontrollgruppe	55

IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1.	Die UICC-Klassifikation des kolorektalen Kolonkarzinoms	7
Tabelle 1.2.	Die Montreal-Klassifikation der Colitis ulcerosa	9
Tabelle 1.3.	Die Rezeptoren des Insulin/IGF-Systems und die Affinität der Liganden	23
Tabelle 2.1.	Chemikalien und Substanzen	32
Tabelle 2.2.	Pufferansätze	32
Tabelle 2.3.	Weitere Materialien, Geräte und Programme	33
Tabelle 3.1.	Patientenkollektiv	41
Tabelle 3.2.	Heterogenität der Insulinrezeptor-Expression innerhalb einer Patientenprobe – Häufigkeiten im Gruppenvergleich	43
Tabelle 3.3.	Verteilung der membranständigen und zytoplasmatischen Färbung des Gesamtkollektivs	45
Tabelle 3.4.	Vorkommen des Kryptengradienten in den Gruppen	48
Tabelle 3.5.	Medianer Histoscore der zytoplasmatischen und membranständigen Insulinrezeptorexpression im Gruppenvergleich	55

V. Anhang

1. Publikation

Steffen M. Heckl, Marie Pellinghaus, Sandra Krüger, Clara Bosselmann, Franziska Wilhelm, Hans-Michael Behrens, Stefan Schreiber und Christoph Röcken. Epithelial insulin receptor expression – prognostic relevance on colorectal cancer. Onkotarget 2018;9(101):37497-37508

2. Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwannenweg 20 · 24105 Kiel

Dr. med. Steffen Heckl
UKSH Campus Kiel
Klinik für Innere Medizin I
Arnold-Heller-Str. 3
24105 Kiel

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-53 33
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 12. September 2016

AZ: D 530/16 (bitte stets angeben)
Studienplan: Expression des Insulinrezeptors bei der Colitis ulcerosa assoziierten Dysplasie und DALM
Basisformular für einen Ethikantrag vom 18.08.16; Studienprotokoll undatiert

Antragsteller und Studienleiter: Dr. Steffen Heckl, Klinik für Innere Medizin I, UKSH Campus Kiel
Antrag vom: 18. August 2016 (Eingang: 24. August 2016)

Sehr geehrter Herr Kollege Heckl,

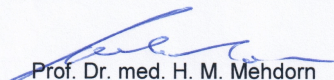
wir bestätigen den Eingang des obengenannten Antrages zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

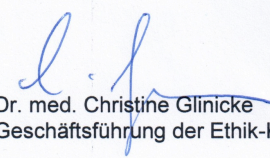
Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

1. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
2. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Studienleiter.
3. Gemäß Deklaration von Helsinki **muss** der Ethik-Kommission nach Studienende ein Abschlussbericht vorgelegt werden, der eine Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Studie enthält.

Wir wünschen Ihnen für die Durchführung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

3. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Clara Sophie Bosselmann, dass ich die eingereichte Dissertation mit dem Titel „Insulinrezeptorexpression im Kontext der Karzinogenese von Colitis ulcerosa-assoziierten und sporadischen kolorektalen Karzinom“ selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe verfasst habe. Es wurden ausschließlich die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Sämtliche wörtliche und nicht wörtliche Zitate sowie Grafiken oder sonstige Materialien aus anderen Werken sind gemäß den wissenschaftlichen Zitierregeln kenntlich gemacht. Die von mir vorgelegte Arbeit ist bisher noch nicht, auch nicht teilweise, veröffentlicht und auch bisher noch in keiner Form als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt worden.

Ich erkläre an Eides statt, dass meine Angaben der Wahrheit entsprechen und ich diese nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe.

Kiel, den 15.11.2021

Clara Sophie Bosselmann

4. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Schreiber bedanken, dass er diese Promotion durch die Bereitstellung des Themas möglich gemacht hat. Ich bedanke mich für die Förderung, Betreuung und Unterstützung sowie das sorgfältige Korrekturlesen.

Für die enge Zusammenarbeit mit dem pathologischen Institut gilt mein Dank außerdem Prof. Dr. Röcken. Durch die Bereitstellung der Labore und Ressourcen konnte diese Arbeit erst entstehen. Für die umfangreiche Unterstützung bei der Auswertung und die wertvollen Hinweise bei der Korrektur meiner Dissertation bin ich sehr dankbar.

Ganz herzlich danken möchte ich außerdem meinem Betreuer Herrn Dr. Heckl für die Anleitung und Unterstützung in jeder Phase dieser Promotion. Er stand mir mit seiner freundlichen und gewissenhaften Art stets zur Seite und hat mit seinen Ideen und seiner Fachkunde meine Arbeit immer gefördert.

Ich bedanke mich zudem bei den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie des UKSH Kiel, die mir bei Fragen und Problemen hilfreich zur Seite standen. Ins Besondere erwähnen möchte ich Frau Krüger, die mich während der praktischen Phase begleitete und mit ihrem Wissen und viel Geduld auch in schwierigen Phasen eine große Hilfe war. Außerdem danke ich Herrn Dr. Behrens für die freundliche Zusammenarbeit bei der statistischen Auswertung sowie die Lösung aller technischen Probleme.

Zu guter Letzt geht ein großer Dank an meine Familie und meinen Freund für den Rückhalt und die Ermunterung während der gesamten Zeit und für ihre bedingungslose Unterstützung in jeder Lebenslage.