

Aus der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

“Prognostischer und prädiktiver Stellenwert
von zirkulierenden Biomarkern
bei neuroendokrinen Neoplasien verschiedenen Ursprungs”

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Tabea Neumann
aus Magdeburg

Datum der Promotion: 04. Juni 2021

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Tafelverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Abstract	1
1.1 Deutsche Fassung	1
1.2 Englische Fassung	2
2 Einleitung	4
2.1 Definition Neuroendokrine Neoplasie	4
2.2 Klinische Charakteristika	4
2.3 Molekulare Charakteristika	5
2.4 Prognostischer Stellenwert von NEN-Klassifizierungen	6
2.5 Zirkulierende Biomarker bei NEN	7
2.5.1 Chromogranin A – etablierter Biomarker bisher ohne standardisiertem Assay	7
2.5.2 Serotonin	8
2.5.3 Multianalytbiomarker	9
2.6 Tumorangiogenese als Grundlage neuer Biomarker - PIGF und Flt-1 -	9
2.6.1 Tumorangiogenese ein klinisch validiertes Target bei pankreatischen NET	9
2.6.2 PIGF – ein Marker für pathologische Angiogenese und Inflammation	10
2.7 Personalisierte Therapie bei NEN – ein unmet medical need	12
2.7.1 Biomarker für personalisierte Therapie	12
3 Patienten und Methoden	14
3.1 Patienten und Studienablauf	14
3.2 Erhebung der Patientendaten	16
3.3 Kontrollkollektiv	16
3.4 Bestimmung von Tumormarkern	16
3.4.1 Bestimmung von CgA	16
3.4.2 Bestimmung von PIGF	18
3.4.3 Bestimmung von sFlt-1	18

3.4.4	Bestimmung von Pro-BNP 2	18
3.4.5	Bestimmung von Serotonin	18
3.5	Auswertung und Statistik	18
4	Ergebnisse	21
4.1	Charakteristika der Patientenkohorten im Vergleich zu gesunden Probanden	21
4.1.1	Charakterisierung des Patientenguts der Kohorte I	21
4.1.2	Charakterisierung des Patientenguts mit dynamischen Messungen (Kohorte II)	25
4.1.3	Charakterisierung gesunder Probanden	27
4.2	Chromogranin A	27
4.2.1	Testgüte von CgA-Assays	27
4.2.2	Univariate Datenanalysen von CgA	31
4.2.2.1	CgA-Spiegel von Patienten mit NEN im Vergleich zu tumorfreien und gesunden Probanden	31
4.2.2.2	CgA-Spiegel von Patienten mit NEN nach der Primärtumorlokalisation	31
4.2.2.3	CgA-Spiegel bei Midguttumoren mit und ohne Karzinoidsyndrom	32
4.2.2.4	CgA-Spiegel von Patienten mit NEN mit unterschiedlichem Grading	32
4.2.2.5	CgA-Spiegel von Patienten mit NEN im Tumorstadium I-III und IV	33
4.2.2.6	CgA-Spiegel von Patienten mit NEN unter Berücksichtigung des Remissionsstatus	33
4.2.2.7	CgA-Spiegel von Patienten mit NEN in Abhängigkeit von der Therapie	34
4.2.3	Verlaufsuntersuchungen von CgA	35
4.2.3.1	Kurzzeit-Verlaufsuntersuchungen von CgA	35
4.2.3.2	Langzeit-Verlaufsuntersuchungen von CgA	36
4.3	Placental Growth Factor	38
4.3.1	Univariate Datenanalysen von PIGF	38
4.3.1.1	PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN im Vergleich zu tumorfreien und gesunden Probanden	38
4.3.1.2	PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN nach der Primärtumorlokalisation	39
4.3.1.3	PIGF-Spiegel bei Midguttumoren mit und ohne Karzinoidsyndrom	40
4.3.1.4	PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN mit unterschiedlichem Grading	41
4.3.1.5	PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN im Tumorstadium I-III und IV	41
4.3.1.6	PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN unter Berücksichtigung des Remissionsstatus	42
4.3.1.7	PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN in Abhängigkeit von der Therapie	43
4.3.2	Verlaufsuntersuchungen von PIGF	44
4.3.2.1	Kurzzeit-Verlaufsuntersuchungen von PIGF	44
4.3.2.2	Langzeit-Verlaufsuntersuchungen von PIGF	45
4.4	soluble Fms-related Tyrosinkinase 1	47
4.4.1	Univariate Datenanalysen von sFlt-1	47

4.4.1.1	sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN im Vergleich zu tumorfreien und gesunden Probanden	47
4.4.1.2	sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN mit unterschiedlichem Grading	48
4.4.1.3	sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN im Tumorstadium I-III und IV	48
4.4.1.4	sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN in Abhängigkeit von der Therapie	48
4.5	PIGF/sFlt-1	49
4.5.1	Univariate Datenanalysen von PIGF/sFlt-1	49
4.5.1.1	PIGF/sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN im Vergleich zu tumorfreien und gesunden Probanden	49
4.5.1.2	PIGF/sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN mit unterschiedlichem Grading	50
4.5.1.3	PIGF/sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN im Tumorstadium I-III und IV	50
4.5.1.4	PIGF/sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN in Abhängigkeit von der Therapie	50
4.6	Serotonin	51
4.6.1	Verlaufsuntersuchungen von Serotonin	51
4.6.1.1	Kurzzeit-Verlaufsuntersuchungen von Serotonin	51
4.6.1.2	Langzeit-Verlaufsuntersuchungen von Serotonin	52
4.7	Prognostische Faktoren für die Zeit bis zur Tumorprogression	53
4.7.1	CgA-Spiegel bei Patienten mit NEN in Relation zur Zeit bis zur Tumorprogression	54
4.7.2	PIGF-Spiegel bei Patienten mit NEN in Relation zur Zeit bis zur Tumorprogression	55
4.7.2.1	PIGF-Spiegel bei pankreatischen NEN in Relation zur Zeit bis zur Tumorprogression	55
4.7.2.2	PIGF-Spiegel bei Midguttumoren in Relation zur Zeit bis zur Tumorprogression	56
4.7.3	PIGF/sFlt-1-Spiegel bei Patienten mit NEN in Relation zur Zeit bis zur Tumorprogression	57
4.7.4	Multivariate Datenanalyse	57
4.8	Korrelation zwischen CgA- und PIGF-Spiegel bei NEN-Erkrankten	58
4.9	Prädiktiver Wert von Tumormarkern nach SSA-Therapieeinleitung	59
4.9.1	Prädiktiver Wert von CgA	59
4.9.2	Prädiktiver Wert von PIGF	61
5	Diskussion	62
5.1	Chromogranin A – Bestimmung durch unterschiedliche Assays	62
5.2	Chromogranin A – ein prognostischer und prädiktiver Biomarker bei NEN	65
5.3	PIGF und PIGF/sFlt-1 – angiogene Biomarker mit prognostischem Potential	66
5.4	Serotoninverhalten unter einer SSA-Therapie	68
	Literaturverzeichnis	70

<i>Eidesstattliche Versicherung</i>	90
<i>Lebenslauf</i>	92
<i>Publikationsliste</i>	94
<i>Danksagung</i>	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika kommerzieller Immunoassays für Chromogranin A (44, 59).....	17
Tabelle 2: Übersicht über Primärtumorlokalisationen	21
Tabelle 3: Häufigkeitsverteilung der Primariuslokalisation bei bestehender Tumorerkrankung.....	23
Tabelle 4: Charakteristika der Patientenkohorte I mit bestehender Tumorerkrankung.....	24
Tabelle 5: Werteverteilung von CgA, PIGF und sFlt-1 des Patientenkollektivs I.....	24
Tabelle 6: Übersicht von Patientenkohorte II	26
Tabelle 7: Werteverteilung von CgA, PIGF und sFlt-1 bei Gesunden.....	27
Tabelle 8: ROC-Analysen nach verwendetem CgA-Assay	28
Tabelle 9: Gütevariablen nach verwendetem CgA-Assay	28
Tabelle 10: Relativer Anteil erhöhter CgA-Spiegel, eingeteilt nach dem Primarius	28
Tabelle 11: Auszug eines Vergleichs der CgA-Assays durch Ermittlung eines	29
Tabelle 12: Vergleich Sensitivitäten und Spezifitäten von CgA (CIS bio-RIACT-Assay) verschiedener Studien	30
Tabelle 13: Vergleich Sensitivitäten und Spezifitäten von CgA (EURIA-Assay) verschiedener Studien	30
Tabelle 14: Kriterien der Gradzuordnung nach der WHO (35).....	33
Tabelle 15: Remissionsstatus (PD, SD) in Bezug auf CgA-Wert < und > 83,2 ng/ml	34
Tabelle 16: Remissionsstatus (PD, SD) in Bezug auf PIGF-Wert < und > 15,35 pg/ml	42
Tabelle 17: Multivariate Analyse für die Zeit bis zur Tumorprogression bei NEN	58
Tabelle 18: Übersicht über die Verteilung der Patienten mit und ohne mindestens 30%igen Abfall von CgA 2 Tage bzw. 2 Monate nach SSA-Beginn mit Zuordnung zum weiteren Tumorverhalten	59
Tabelle 19: Übersicht über die Verteilung der Patienten mit und ohne mindestens 10%igen Abfall von PIGF 2 Tage und 2 Monate nach SSA-Beginn mit Zuordnung zum weiteren Tumorverhalten	61

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wirkung von PIGF	11
Abbildung 2: Tumorfreiheit nach Zuordnung des Primarius.....	22
Abbildung 3: Korrelationsanalyse der CgA-Werte des KRYPTOR- und CIS bio- RIACT-Assays bei Patienten mit NEN	29
Abbildung 4: Erhöht gemessene CgA-Werte bei Patienten mit NEN versus tumorfreie Patienten und der Kontrollkohorte, als auch bei tumorfreien Patienten versus der Kontrollkohorte	31
Abbildung 5: CgA-Werte von Patienten mit NEN nach unterschiedlicher Primärtumor-lokalisierung im Vergleich	32
Abbildung 6: CgA-Spiegel abhängig von der durchgeführten Therapie zum Zeitpunkt der Blutentnahme (keine Therapie, SSA, Chemotherapie)	34
Abbildung 7: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 01-05.....	35
Abbildung 8: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 06-10.....	35
Abbildung 9: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 11-15.....	36
Abbildung 10: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 16-19.....	36
Abbildung 11: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 02, 06, 08, 09 und 15 mit fortschreitender Erkrankung innerhalb der folgenden 2 Jahre	37
Abbildung 12: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 01, 03-05 und 07 mit stabiler Erkrankung	37
Abbildung 13: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 10-13 mit stabiler Erkrankung	37
Abbildung 14: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 14, 16-18 mit stabiler Erkrankung.....	38
Abbildung 15: PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN und tumorfreien Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrolle	39
Abbildung 16: ROC-Kurve von PIGF	39
Abbildung 17: PIGF-Werte von Patienten mit NEN nach unterschiedlicher Primärtumor-lokalisierung (Bronchiales System/Lunge (n=1); Magen (n=6); Duodenum (n=3); Pankreas (n=28); Jejunum/Ileum (n=44); Appendix (n=1); Zökum (n=4); Rektum (n=3); außerhalb des GEP- Systems (n=3); CUP (n=9); MEN-1 (n=3)) im Vergleich	40

Abbildung 18: Erhöhte PIGF-Spiegel von Patienten mit Midguttumoren mit Karzinoidsyndrom (n=34) im Vergleich zu Midgut-Patienten ohne Karznoidsyndrom (n=15)	41
Abbildung 19: PIGF-Spiegel von Patienten mit Midguttumoren mit Karzinoidsyndrom mit (n=13) und ohne Herzerkrankung (n=21)	41
Abbildung 20: Assoziation erhöhter PIGF-Werte mit dem Tumorstadium IV (n=92) im Vergleich zum Tumorstadium I-III (n=13).....	42
Abbildung 21: Erhöhte PIGF-Spiegel bei Chemotherapie-behandelten Patienten im Vergleich zu NEN-Patienten, die keine oder eine SSA-Therapie erhielten.....	43
Abbildung 22: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 01-05	44
Abbildung 23: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 06-10	44
Abbildung 24: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 11-15	45
Abbildung 25: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 16-19	45
Abbildung 26: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 02, 06, 08, 09, 15 mit fortschreitender Erkrankung innerhalb der folgenden 2 Jahre	46
Abbildung 27: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 01, 03-05 und 07 mit stabiler Erkrankung	46
Abbildung 28: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 10-13 mit stabiler Erkrankung	46
Abbildung 29: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 14, 16-18 mit stabiler Erkrankung.....	47
Abbildung 30: sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN und tumorfreien Patienten im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv	48
Abbildung 31: ROC-Kurve von sFlt-1	48
Abbildung 32: sFlt-1-Spiegel von NEN-Patienten mit NEN, sortiert nach der Art der erhaltenen Therapie.....	49
Abbildung 33: Ratio PIGF/sFlt1 von Patienten mit NEN und tumorfreien Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrolle	50
Abbildung 34: ROC-Kurve von PIGF/sFlt-1	50
Abbildung 35: Serotonin-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 01-05	51
Abbildung 36: Serotonin-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 06-08, 10, 11.....	51

Abbildung 37: Serotonin-Wert-Verlaufsuntersuchung Tag 0-2 von Patient 12-15, 19.....	52
Abbildung 38: Serotonin-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 02, 06, 08 und 15 mit fortschreitender Erkrankung innerhalb der folgenden 2 Jahre	52
Abbildung 39: Serotonin-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 01, 03-05 und 07 mit stabiler Erkrankung	53
Abbildung 40: Serotonin-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 10-14 mit stabiler Erkrankung.....	53
Abbildung 41: Bestätigung des prognostischen Potentials von CgA anhand einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezogen auf die Zeit bis zur Tumorprogression bei NEN	54
Abbildung 42: Bestätigung der prognostischen Relevanz von PIGF anhand einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezogen auf die Zeit bis zur Tumorprogression bei neuro-endokrinen Midguttumoren.....	56
Abbildung 43: Bestätigung der prognostischen Relevanz von PIGF/sFlt-1 anhand einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezogen auf die Zeit bis zur Tumorprogression bei NEN	57
Abbildung 44: Korrelationsanalyse von PIGF und CgA bei Patienten mit NEN	58
Abbildung 45: Bestätigung des prädiktiven Wertes von CgA hinsichtlich einer SSA- Therapie bei NEN zwei Tage nach Therapieinitiiierung anhand einer Kaplan-Meier-Kurve.....	60
Abbildung 46: Bestätigung des prädiktiven Wertes von CgA hinsichtlich einer SSA- Therapie bei NEN zwei Monate nach Therapieinitiiierung anhand einer Kaplan-Meier-Kurve.....	60

Tafelverzeichnis

Tafel 1	: Flussdiagramm zur Identifizierung und Rekrutierung von Patienten in Kohorte I, II.....	15
Tafel 2	: Anfertigung der Vierfeldertafel und Berechnung von Sensitivität und Spezifität.....	19

Abkürzungsverzeichnis

NEN	Neuroendokrine Neoplasie(n)
CgA	Chromogranin A
PIGF	Placental Growth Factor
sFlt-1	soluble Fms-related tyrosine kinase-1/ lösliche Fms-related Tyrosinkinase-1
SSA	Somatostatin-Analoga
TTP	Time To Progression/ Zeit bis zur Tumorprogression
GEP	gastroenteropankreatisch/en
MEN-1	Multiple endokrine Neoplasie Typ 1
WHO	World Health Organisation/ Weltgesundheitsorganisation
UICC	Union for International Cancer Control
NET	Neuroendokrine(r) Tumor(e)
NEC	Neuroendokrine(s) Carzinom(e)
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
AJCC	American Joint Committee on Cancer
NSE	Neuronenspezifische Enolase
CEA	Carcinoembryonales Antigen
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
RIA	Radioimmunoassay
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
pNET	pankreatische neuroendocrine Tumore
Flt-1	Fms-related tyrosine kinase-1/ Fms-related Tyrosinkinase-1
VEGFR-1/2	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1/2
SNP	Single Nucleotide Polymorphism/ Einzelnukleotid-Polymorphismus
Pro-BNP 2	Pro Brain Natriuretic Peptide 2
ICM	Ischemic Cardiomyopathy/ Ischämische Kardiomyopathie
p	Signifikanzwert
ROC	Receiver Operating Characteristic
AUC	Area Under the Curve
CUP	Cancer of Unknown Primary/ Tumor unbekannter Lokalisation
r	Korrelationsfaktor
n.s.	nicht signifikant

RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
PD	Progressive Disease/ progressive Erkrankung
SD	Stable Disease/ stabile Erkrankung
HR	Hazard Ratio

1 Abstract

1.1 Deutsche Fassung

Die Prognoseabschätzung von neuroendokrinen Neoplasien (NEN) ist nur mit viel Erfahrung und unter Einbeziehung verschiedener Fachdisziplinen möglich. Derzeit sind Ki-67, der Proliferationsmarker im Tumorgewebe, bzw. die Mitosezahl die bedeutsamsten Marker, die Aussagen über die Prognose treffen können.

Etablierte Tumormarker bei NEN sind Chromogranin A (CgA) und Serotonin insbesondere beim Karzinoidsyndrom. CgA kann sowohl im Gewebe, als auch im Serum oder Plasma bestimmt werden. Allerdings bleibt CgA auch nach langjährigem klinischem Einsatz in seiner prognostischen und prädiktiven Wertigkeit unbefriedigend. Zudem existieren unterschiedliche Messmethoden, aber kein standardisierter Assay. Eine optimale Standardisierung der CgA-Diagnostik sowie die Etablierung neuer Biomarker wird benötigt um die Einschätzung des Tumorverhaltens zu verbessern.

Die Angiogenese spielt eine bedeutende Rolle bei NEN, wird aber durch etablierte prognostische Biomarker nicht abgebildet. Ziel dieser Arbeit soll die Untersuchung des Wachstumsfaktors "Placental Growth Factor" (PlGF), sowie des Inhibitors "soluble Fms-related Tyrosinkinase-1" (sFlt-1) als prognostischer und prädiktiver Biomarker bei Patienten mit NEN sein. Ferner soll der robusteste CgA-Assay identifiziert und mit der Wertigkeit von PlGF verglichen werden.

Von Patienten mit histologisch gesicherten NEN erfolgten Blutentnahmen zur Bestimmung von CgA, PlGF, sFlt-1 und Serotonin. Zur Messung der Biomarker wurden etablierte, in die Routinediagnostik von NEN (CgA, Serotonin) oder Präeklampsie (PlGF, sFlt-1) zugelassene Assays verwendet.

Hierbei wurden zwei Patientenkollektive (Kollektiv I mit Einpunktmessungen, 132 Patienten, hiervon 49 Patienten Midgut-NEN, 28 Patienten Pankreas-NEN, Kollektiv II mit repetitiven Messungen, 19 Patienten) untersucht.

Beim Kollektiv I erfolgte eine Korrelation von Biomarkern mit dem Tumorverlauf. Beim Patientenkollektiv II wurden Biomarker vor und nach einer Somatostatin-Analoga-Therapie (SSA) gemessen.

Im Methodenvergleich wurde für CgA der KRYPTOR-Assay aufgrund stabiler Ergebnisse, einer automatisierten Handhabung, einer hohen Sensitivität und Effizienz als die beste Methode evaluiert. Nichtsdestotrotz wiesen 25% der Patienten mit fortgeschritte-

nen Tumoren einen normalen CgA-Wert auf.

In der Gesamtkohorte waren sämtliche untersuchten Biomarker bei Patienten mit NEN erhöht. Der prognostische Wert konnte für CgA und PIGF bestätigt werden. In der multivariaten Datenanalyse zeigte PIGF einen Mehrwert gegenüber CgA bei der Einschätzung der Zeit bis zur Tumorprogression (TTP). CgA und Serotonin zeigten nach SSA-Einleitung einen Abfall in den dynamischen Messungen. Für CgA konnte diesbezüglich ein prädiktives Potential nachgewiesen werden.

Zusammenfassend besitzt PIGF das Potential als prognostischer Tumormarker bei NEN, vor allem im fortgeschrittenen Krankheitsstadium genutzt zu werden bei Patienten, die keine CgA-Erhöhung aufweisen. Aufgrund möglicher Störfaktoren sollten weitere Untersuchungen erfolgen, um erhöhte PIGF-Werte richtig interpretieren zu können. Die klinische Relevanz von sFlt-1 bleibt ungewiss. Überdies bewährt sich CgA zum Monitoring des Verlaufs bei SSA-Therapie.

1.2 Englische Fassung

Prognosis estimation of neuroendocrine neoplasia (NEN) remains a clinical challenge best addressed by multidisciplinary expert teams. Currently, tissue based determination of the proliferation marker Ki-67 or the number of mitoses combined with morphological assessment of differentiation provide the best available prognostic information. Established tumor markers in NEN are chromogranin A (CgA) and serotonin especially in carcinoid syndrome. CgA can be detected not only in tissue, but also in serum or plasma. Despite CgA long-term clinical use, its prognostic and predictive value has remained a matter of debate with different measuring methods as additional confounders. Optimal standardization of CgA diagnostics and the development of new biomarkers are thus needed to improve the assessment of tumor behavior.

Angiogenesis plays an important role in NEN, but is not reflected by established prognostic biomarkers. This work therefore investigated "Placental Growth Factor" (PIGF) and the inhibitor "soluble Fms-related tyrosine kinase-1" (sFlt-1) as prognostic and predictive biomarker in patients with NEN. Furthermore aimed to identify the most robust CgA assay and to compare the prognostic and predictive performance of CgA and PIGF. Circulating CgA, PIGF, sFlt-1 and serotonin were determined in established assays approved for routine diagnosis in NEN (CgA, Serotonin) or preeclampsia (PIGF, sFlt-1).

Samples from 2 patient groups with histologically proven NEN were examined. In collec-

tive I single-point biomarker measurements with the course of the disease (132 patients, 49 patients midgut NEN, 28 patients pancreatic NEN), in collective II (19 patients), biomarkers were measured before and repeatedly after a somatostatin analogue (SSA) therapy.

The KRYPTOR assay emerged as best method for CgA determinations due to stable results, automated handling, high sensitivity and efficiency.

In the overall cohort, all biomarkers were elevated in patients with NEN. However, 25% of patients with advanced tumors had normal circulating CgA. Monovariate analysis identified CgA and PIGF as prognostic parameters with respect to time to disease progression (TTP). Multivariate data analysis confirmed PIGF but not CgA as an independent parameter for TTP. CgA and serotonin showed a drop in dynamic measurements after initiation of SSA. For CgA, a predictive potential could be demonstrated.

In summary, PIGF emerged a promising prognostic tumor marker in NEN, especially in advanced stage disease and patients with normal CgA levels, encouraging further evaluation in NEN. The clinical relevance of sFlt-1 remains uncertain. In addition, CgA is also successful in monitoring the progress of SSA therapy.

2 Einleitung

2.1 Definition Neuroendokrine Neoplasie

Neuroendokrine Neoplasien sind epitheliale Tumore, die neurosekretorische Vesikelproteine besitzen. Die immunhistochemische Analyse mit Nachweis von Synaptophysin in small-dense-core-Vesikeln oder von Chromogranin A in large-dense-core-Vesikel ist für die Diagnose NEN definierend (1). NEN entwickeln sich phänotypisch aus dem disseminierten neuroendokrinen Zellsystem durch maligne Entartung (2, 3). In etwa 67% der Fälle ist der Primärtumor im gastroenteropankreatischen (GEP) System, zu 25% im tracheobronchopulmonalen (4). Zu den seltenen Primärtumorlokalisationen zählen unter anderem das Ovar oder der Thymus (4).

2.2 Klinische Charakteristika

NEN stellen eine heterogene Gruppe von Neoplasien dar, die Besonderheiten bezüglich ihrer Biologie durch genetische, funktionelle, organspezifische und prognostische Diversität aufweisen (5-7). Diese Tumorart gehört mit einer Inzidenz von 6,98 Personen pro 100.000 Einwohner (2012) zu den seltenen Tumorentitäten (8).

In etwa 21% der Fälle manifestiert sich klinisch eine hormonell bedingte Funktionalität im Sinne eines Hypersekretionssyndrom (9, 10). Die Leitsymptome bei Patienten mit klinischer Funktionalität variieren je nach Hormonüberschuss. Sie reichen von Flush, Diarrhoe, Bronchospasmus und Herzinsuffizienz durch Endokardfibrose bei dem Karzinoïdsyndrom (11-14) bis zu multiplen peptischen Ulcera, rezidivierenden Diarrhoen und gastroösophagealen Reflux beispielsweise beim Gastrinom in Form des Zollinger-Ellison-Syndroms (12, 14).

Die Mehrheit der NEN weist klinisch keine endokrinologische Symptomatik auf und wird als nichtfunktionelle NEN klassifiziert (7). Die assoziierten Beschwerden sind häufig nicht spezifisch. Auch bei nichtfunktionellen NEN kann eine Produktion von Peptidhormonen und biogenen Aminen vorliegen, die als Folge der hepatischen Metabolisierung asymptomatisch bleibt (3, 15). Besonders hormoninaktive NEN werden meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (3, 14, 15). So weisen circa 70%-76% der Patienten bei Erstdiagnose bereits Metastasen auf (16, 17).

2.3 Molekulare Charakteristika

Die Mehrzahl der NEN tritt sporadisch auf. Nur ein sehr kleiner Teil dieser Tumorgruppe ist hereditär bedingt im Rahmen komplexer familiärer endokriner Syndrome (9, 18). Hierzu zählt das multiple endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN1) -Syndrom mit Ausbildung von Malignomen in der Nebenschilddrüse, Adenohypophyse und im gastroenteropankreatischen Trakt (18-20). Die inaktivierende MEN-1-Gen-Mutation führt unter anderem in etwa 40% der Patienten mit MEN1-Syndrom zu kleinsten multiplen Gastrinomen vor allem im Duodenum oder Pankreas (19, 20). Bemerkenswert ist jedoch, dass häufig auch sporadisch auftretende pankreatische NEN insbesondere Gastrinome sowie NEN in der Lunge (Karzinoide) inaktivierende Mutationen im MEN1-Gen aufweisen (21-25). Neben der häufigen Mutation im MEN1-Gen wurden in sporadischen pankreatischen NEN ebenso Inaktivierungen im VHL- und TSC1/2-Genen und Hyperaktivierungen in PI3K/mTOR-Signalwegen gefunden (26). Vor kurzem wurde die Inaktivierung der Gene ATRX und DAXX in pankreatischen NEN erkannt. In der Molekularpathogenese von pankreatischen NEN wird diese Inaktivierung des ATRX/DAXX-Komplexes bei der späten neoplastischen Transformation eine bedeutende Rolle zugesprochen. Die Inaktivierung führt zu einer alternativen Verlängerung der Telomeren und korreliert mit höheren Tumorstadien. Der Nachweis der Inaktivierung von ATRX und DAXX im Gewebe ist zudem mit einer schlechteren Prognose assoziiert (26).

Darüber hinaus wurden weitere gewebebasierte Marker für die prognostische Einschätzung identifiziert. So findet sich häufig eine HIC-1-Promotormethylierung - einem nachgeschalteten Gen von TP53 bei NEN im Pankreas. Seine Expression ist im Gewebe messbar und ist mit einer besseren Prognose assoziiert. Des Weiteren liegt in circa 20-50% eine vermehrte Methylierung des Gens CDKN2A in pankreatischen NEN vor. Als negativer Regulator des Zellzyklus führt sein Funktionsverlust zu einer vermehrten Proliferation und korreliert mit einer schlechten Prognose. Ferner kann eine Hypomethylierung der Gene LINE1 und ALU im Gewebe von NEN vorliegen und ebenso mit einer schlechteren Prognose assoziiert sein (27).

Inzwischen liegen auch Transkriptomanalysen von pankreatischen (24, 28, 29) bzw. pankreatischen und intestinalen NEN (30) vor, aus denen komplexe Signaturen abgeleitet wurden, die NEN Subgruppen mit unterschiedlicher Tumorbilogie identifizieren. Bisher finden derartige Signaturen allerdings keine Anwendung in der Klinik.

2.4 Prognostischer Stellenwert von NEN-Klassifizierungen

Trotz der gemeinsamen neuroendokrinen Herkunft variiert die 5- und 10-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit NEN in Abhängigkeit von der Primärtumorlokalisation und Primärtumorgröße sowie der Metastasierung, der histologischen Differenzierung und einer eventuell vorliegenden Funktionalität (17, 31). Diese finden in der Weltgesundheitsorganisation (WHO)-Klassifikation von 2010/2017/2019 und in der TNM-Klassifikation der Union for International Cancer Control (UICC) Berücksichtigung.

Neuroendokrine Neoplasien werden nach der WHO in neuroendokrine Tumore (NET), G1 und G2, die zusammen etwa 90% der NEN ausmachen, und in G3-NEN klassifiziert. Die Gradeinteilung G1, G2 oder G3 beschreibt hierbei das Proliferationsverhalten von NEN anhand des Proliferationsmarkers Ki-67 in % oder der Mitosezahl im Schnittpräparat (32, 33). G1 umfasst einen Proliferationsgrad kleiner, gleich 2%, G2 von 3 bis 20%, und G3 entspricht einem Proliferationsgrad größer 20% (32). Im Jahre 2017 aktualisierte die WHO die G3 Klassifikation für Neoplasien mit Primarius im Pankreas (34, 35), im Jahr 2019 für GEP-NEN (36). Demnach werden G3-Neoplasien nach der histologischen Differenzierung in hochdifferenzierte neuroendokrinen Tumore und schlechtdifferenzierte neuroendokrine Karzinome (NEC) unterteilt (34-36). Außerdem verschiebt sich der cut-off zwischen G1 und G2 derart, dass Tumore mit Ki-67 Fraktionen <3% in der G1 Gruppe zusammengefasst werden (34).

Der alte Begriff Karzinoid, der 1907 von Oberndorfer eingeführt und geprägt wurde (37, 38), behält auch in der aktuellen Klassifikation bei G1-Neoplasien seine Gültigkeit (33). Die WHO ist der Auffassung, dass alle NEN ein gewisses malignes Potential besitzen, sich jedoch in der Metastasierungswahrscheinlichkeit voneinander unterscheiden (33). Unter Berücksichtigung der Tumorbiologie erhält daher diese Klassifikation eine prognostische Aussagekraft (33, 39). Darüber hinaus werden die NEN nach den TNM-Stadien der ENETS (European Neuroendocrine Tumor Society) und der AJCC (American Joint Committee on Cancer) beziehungsweise UICC stratifiziert. In diesen Systemen werden die Neoplasien nach den Parametern Tumorgröße und -infiltrationstiefe [T], Lymphknotenstatus [N] und Fernmetastasierung [M] getrennt dargestellt und anschließend den Tumorstadien I bis IV zugeordnet. Die TNM-Klassifikation erlangt dadurch unter den Prognosefaktoren derzeit einen großen Stellenwert (39-43). Ferner wurden NEN durch Williams und Sandler 1963 nach lediglich embryogenetischen Kriterien in Foregut (Lunge, Oesophagus, Magen, proximales Duodenum, Pankreas), Midgut

(distales Duodenum, Jejunum, Ileum, Zökum, Appendix, Colon ascendens) und Hindgut (Colon transversum, Colon descendens, Sigmoid, Rektum) eingeteilt (38).

Die prognostische Einschätzung dieser Systeme weist allerdings gerade im Stadium IV mit bereits stattgefundener Metastasierung Limitationen auf.

Um die Prognose im Stadium IV abschätzen zu können, bedarf es daher weiterer Marker.

2.5 Zirkulierende Biomarker bei NEN

Hierbei bieten sich zirkulierende Biomarker, die im Blut oder auch im Urin gemessen werden können, an. Als klinisch etablierte Biomarker sind der Nachweis von CgA in Serum oder Plasma sowie der indirekte Nachweis von Serotonin anhand des Metaboliten 5-Hydroxyindolylessigsäure im 24h Sammelurin zu nennen. Daneben ist auch der direkte Nachweis von Serotonin im Plasma möglich.

2.5.1 Chromogranin A – etablierter Biomarker bisher ohne standardisiertem Assay

Chromogranin A stellt einen etablierten Tumormarker bei NEN dar, der sich sowohl im Gewebe wie auch als zirkulierender Biomarker bei NEN nachweisen lässt.

CgA gehört der Gruppe der Granine an. Dies sind granular-assoziierte Moleküle, die für die regulierte Sekretion von Hormonen und Neurotransmittern sehr bedeutsam sind. CgA wird vor der Exozytose zusammen mit den Sekretionsprodukten in Vesikeln gespeichert und später mit diesen co-sezerniert. (3, 44-47) Seine Expression ist unter anderem von der Anzahl der Granula pro Zelle (44, 48) und somit vom Differenzierungsgrad abhängig. So können kleinzellige, entdifferenzierte NEN aufgrund weniger Granula auch CgA-negativ sein.

Als zirkulierender Biomarker kann CgA auch im Blut nachgewiesen werden. Es ist hierbei anderen Tumormarkern wie der neuronenspezifischen Enolase (NSE) oder dem carcinoembryonalem Antigen (CEA) in Studien überlegen (49, 50). Es stellt einen relativ sensitiven und zugleich unspezifischen Biomarker dar (51), da es nicht nur von NEN sondern auch von Nervengewebe sezerniert wird (46). CgA besitzt sowohl eine Relevanz bei funktionellen als auch bei nonfunktionellen Neoplasien (11, 46, 51). So können erhöhte CgA-Werte durch eine verstärkte Sekretionsrate bedingt sein, andererseits aber auch weitestgehend mit der Tumormasse korrelieren (52-54). Ferner gibt es Hinweise,

dass ein Anstieg von CgA eine Rekurrenz anzeigt (49, 55). Jedoch besitzt CgA auch Limitationen. So können erhöhte CgA-Werte im Zusammenhang mit einer Medikation mit Protonenpumpenhemmer (56, 57), einer Niereninsuffizienz (57) oder auch einem nicht ausreichend eingestellten arteriellen Hypertonus stehen (58). Eine weitere Limitation ist, dass CgA nur eine ca. 70-80%ige Sensitivität bei NEN besitzt (3, 57). Daher kann dieser Tumormarker bei einigen Patienten nicht erhöht gemessen werden. Umgekehrt ermöglichen normale CgA-Spiegel keinen sicheren Ausschluss einer NEN.

Zur Bestimmung von CgA im Serum oder Plasma stehen mehrere antikörperbasierte hochempfindliche Methoden der Bioanalytik zur Verfügung. Diese variieren jedoch stark in der Epitop-Spezifität, der Abstammung der Antikörper (monoklonal / polyklonal), der Messmethodik (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) / Radioimmunoassay (RIA)) sowie der Maßeinheiten, was nachfolgend in teilweise erheblich unterschiedlichen Resultaten in der im Jahre 2003 durchgeführten Studie von Stridsberg mündete (59). Kompliziert wird die Bestimmung von CgA durch die komplexe proteolytische Prozessierung des Granins, wobei gewebespezifische Muster von Fragmenten entstehen. Entsprechend wird auch für die Tumorsituation angenommen, dass NEN mit unterschiedlichem Primum CgA verschieden spalten (46, 60) und möglicherweise die heterogenen Fragmente von den verschiedenen Assays unterschiedlich erfasst werden. Eine direkte Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Nachweisverfahren ist bisher nicht gegeben (59).

Aus den dargestellten Gründen soll im Rahmen dieser Dissertation eine erneute Evaluation der Gütevariablen (Spezifität und Sensitivität) bei Assays der Hersteller DAKO GmbH, Thermo Fisher Scientific B-R-A-H-M-S GmbH, CIS bio GmbH und Euro Diagnostica AB durch Messung von CgA bei Patienten mit NEN erfolgen. Anschließend soll eine erneute Evaluation der prädiktiven und prognostischen Relevanz von CgA erfolgen. Der Terminus prädiktiv umfasst in der hier vorgelegten Arbeit die Vorhersage des Therapieansprechens, prognostisch die Vorhersage des Krankheitsverlaufs. Des Weiteren soll ein Vergleich von CgA mit neueren Tumormarkern stattfinden - für die aufgrund der oben beschriebenen Limitationen von CgA unverändert großer Bedarf besteht.

2.5.2 Serotonin

Einen bereits etablierten Tumormarker bei NEN mit bestehender Funktionalität stellt Serotonin dar. Dieses spielt eine wichtige Rolle bei der Ausbildung eines Karzinoidsyn-

droms, dem klinisch häufigsten Hypersekretionssyndrom bei NEN (61). Welche Bedeutung Serotonin für die Tumorprogression bei NEN hat, ist unklar– Serotonin erscheint aber prognostisch bezüglich des Gesamtüberlebens (62). Es gibt Hinweise, dass Serotonin die Proliferationen in NEN-Zellen fördern kann (63, 64).

2.5.3 Multianalytbiomarker

Vor kurzem wurde ein RNA-basierter Blutmolekulartest entwickelt, der NETest[®], bei dem 51 spezifische Gene im Blut gemessen werden und nachfolgend mit Hilfe eines Algorithmus analysiert werden (65, 66). Insbesondere für gut differenzierte GEP-NET wurde ein prognostisches und prädiktives Potential nachgewiesen (67). Der Stellenwert im klinischen Alltag bleibt abzuwarten.

2.6 Tumorangiogenese als Grundlage neuer Biomarker - PlGF und Flt-1 -

2.6.1 Tumorangiogenese ein klinisch validiertes Target bei pankreatischen NET

Es ist bekannt, dass das Wachstum und die Progression von Tumoren von der Vaskularisation abhängen (68). Gastroenteropankreatische NEN stellen eine sehr gefäßreiche Tumorentität dar (69-71). Sie produzieren verschiedene Wachstumsfaktoren, die für die pathophysiologische Gefäßneubildung bedeutend sind. So beispielsweise Wachstumsfaktoren der VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)-Familie, denen eine großen Rolle bei der Tumorausdehnung und Progression zugesprochen wird (3, 72). Neuroendokrine Neoplasien, beispielsweise im Pankreas, weisen häufig eine starke VEGF- und VEGF-Rezeptor-Expression auf (3, 73-75). Diese Überexpression kann als para- und autokrine Wachstumsstimulation verstanden werden. In einer Studie waren hohe VEGF-Spiegel zum Teil mit einer vermehrten Vaskularisation bei NEN und darüber hinaus mit einem geringeren progressionsfreien Überleben assoziiert (76). Jedoch stellte sich heraus, dass VEGF als prognostischer Marker nicht robust für die klinische Anwendung zu sein scheint.

Für die Testung weiterer angiogener Faktoren der VEGF-Familie als Biomarker spricht die Wirksamkeit von Sunitinib - einem Tyrosinkinase-Inhibitor von VEGF-Rezeptoren bei nicht resezierbaren, gutdifferenzierten neuroendokrinen Tumoren des Pankreas (pNET) mit Tumorprogress (77).

2.6.2 PIGF – ein Marker für pathologische Angiogenese und Inflammation

Einen viel versprechenden Ansatz bietet der Wachstumsfaktor PIGF. Dieser Faktor wurde durch Dr. Graziella Persico in Neapel im Jahre 1991 entdeckt und stellt gleichfalls ein Mitglied der VEGF-Familie dar (78, 79). Durch alternatives Spleißen kann dieser Wachstumsfaktor in vier Isoformen (PIGF1-4) auftreten (78). PIGF ist typischerweise im Rahmen pathologischer Prozesse, sowie während der Schwangerschaft exprimiert (78, 79). Im Stroma des Tumors führt PIGF zu einer veränderten pathologischen Angiogenese einerseits durch Förderung der Neovaskularisation durch Proliferation (78-80) und Erhalt von Endothelzellen (78-82) sowie von glatten Muskelzellen (78-80, 82, 83). Andererseits bewirkt PIGF die Migration von Stamm- (80, 84), Vorläufer- (78-80, 82, 85, 86), Stroma - (80) sowie Zellen des Immunsystems (87), die weitere angiogene Faktoren enthalten (78-80).

Auf Zellebene führt die Bindung von PIGF an dem Rezeptor Flt-1 (Fms-related Tyrosinkinase 1), auch bekannt als VEGFR-1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1) zu einer molekularen Wechselwirkung zwischen VEGFR-1 und VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2), wodurch die VEGF-induzierte Neovaskularisation verstärkt wird (80, 88, 89). PIGF induziert durch Bindung an Neuropilin-1-Rezeptoren ferner das Wachstum und das Überleben der Tumorzelle (90).

Darüber hinaus kann PIGF die Progression und Metastasierung von einigen soliden Tumoren teilweise durch Hemmung der Ausreifung dendritischer Zellen fördern (79, 80).

Eine schematische Übersicht der PIGF-vermittelten Wirkungen an den einzelnen Effektorzellen zeigt Abbildung 1.

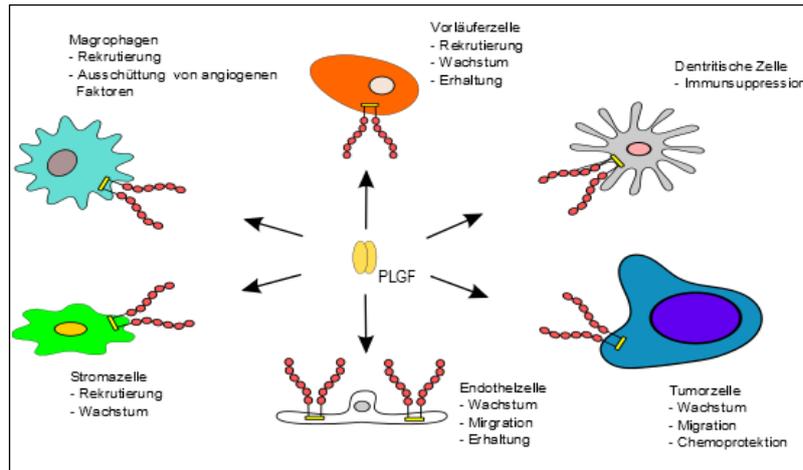


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Wirkung von PIGF

Die Gefäßneubildung durch PIGF erfolgt durch Rekrutierung und Aktivierung unterschiedlicher Zellarten wie Endothelzellen, Makrophagen und Vorläuferzellen. Zudem tritt eine Unterdrückung der Immunantwort durch Hemmung der Reifung dendritischer Zellen ein. Diese Mechanismen begünstigen das Tumorwachstum und die Verbreitung.

(Anlehnung an Pompeo et. al. (91), Fischer et. al. (80))

Aus bereits durchgeführten Studien gibt es Hinweise, dass erhöhte PIGF-Spiegel mit einer schlechten Prognose solider Tumore korrelieren (78, 92, 93). Im Rahmen klinischer Studien wird PIGF aktuell auch als therapeutisches Target evaluiert.

Es ist jedoch auch aus experimentellen Daten bekannt, dass PIGF das Wachstum von Tumoren und die Gefäßneubildung hemmen kann. Die Bildung von VEGF-PIGF Heterodimeren besitzt einerseits eine niedrigere wachstumsfördernde Aktivität als die von VEGF-Homodimeren und führt gleichzeitig zu einem verstärkten Abbau von VEGF (78, 80, 94).

Ein mit PIGF funktionell eng verknüpfter Regulator der Angiogenese stellt die lösliche Fms-related Tyrosinkinase-1, abgekürzt als sFlt-1, dar. Der Marker sFlt-1 entspricht dabei dem löslichen, verkürzten, extrazellulärem Teil vom VEGF-1-Rezeptor (80, 82, 95). sFlt-1 entsteht vermutlich durch alternatives Spleißen oder weniger wahrscheinlich durch proteolytische Spaltung aus VEGFR-1 (82, 96). Vermutlich existieren von sFlt-1 mindestens vier verschiedene lösliche VEGFR1-Proteine (96). sFlt-1 wird unter anderem von Endothelzellen, Immunzellen der unspezifischen Abwehr sowie von sauerstoffminderversorgten glatten Muskelzellen und Tumorzellen exprimiert (82, 95, 96).

sFlt-1 scheint eine Rolle bei der Gefäßstabilisierung im pathophysiologischen Sinn zu haben (82, 96). Der funktionelle Bezug zu PIGF ergibt sich aus dem hemmenden Effekt auf der Bindung von VEGF-Rezeptor-Liganden (VEGF Sequestrierung) wie freiem PIGF, oder auf Heterodimerisierung mit intakten VEGFR1-Monomeren, die aufgrund

des Fehlens der Tyrosinkinase-Domäne im sFlt-1-Anteil dann keine intrazelluläre Signaltransduktion auslösen können (96). Aktuell existiert keine Studie zur klinischen Relevanz von sFlt-1 bei NEN.

Durch die zuletzt genannten Fakten besteht ein wachsendes Interesse, an PlGF und sFlt-1 als Biomarker weiter zu forschen. Hauptaugenmerk soll in der vorliegenden Dissertationsschrift die Überprüfung der klinischen Wertigkeit dieser potentiellen neuen prognostischen Marker im Hinblick auf die Zeit bis zur Tumorprogression sein. Ebenso sollen Faktoren, die diese Parameter beeinflussen können, identifiziert werden.

2.7 Personalisierte Therapie bei NEN – ein unmet medical need

Es steht derzeit eine Fülle verschiedener Therapien zur Behandlung von NEN zur Verfügung (Chemotherapie auf Basis von Streptozotocin in Kombination mit 5-Fluorouracil oder Doxorubicin, Somatostatin-Analoga, lokale Verfahren wie Hochfrequenzablation und Chemoembolisation, Radionuklidtherapie) (97, 98).

Zurzeit rücken zielgerichtete Therapien wie der Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib und der mTOR-Inhibitor Everolimus insbesondere für Patienten, bei denen konventionelle Therapien zu keiner Stabilisierung der Tumorerkrankung geführt haben, in den Vordergrund (99). Derzeit ist jedoch unklar, welcher Patient von welcher Therapieart zu welchem Zeitpunkt der Erkrankung profitiert. Die Therapie wird lediglich durch Berücksichtigung der Komorbiditäten, des Toxizitätsprofils und die Verfügbarkeit des Arzneimittels gewählt (99). Ziel der personalisierten Medizin ist daher, mithilfe von prädiktiven Biomarkern das Ansprechen der Behandlung vor Therapiebeginn vorherzusagen.

2.7.1 Biomarker für personalisierte Therapie

Aktuell sind keine Biomarker für die personalisierte Therapie bei NEN verfügbar mit der Einschränkung, dass der Nachweis von Somatostatin-Rezeptorpositivität für peptidvermittelte Radiorezeptorthherapie genutzt wird (1). In Studien wurden Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) in mRNA und Proteine bei Patienten mit NEN, welche mit Sunitinib/Everolimus behandelt wurden, analysiert. Hierfür wurden als mögliche Biomarker Proteine des VEGF-Pathway's (SNP im VEGFR-3: rs307826 / rs307821), Interleukin-6, Interleukin-8, Osteopontin, stromal cell-derived Factor 1 α , CgA und neuronenspezifische Enolase identifiziert (99, 100). Insbesondere waren unter Sunitinib SNP des VEGFR-3 und unter Everolimus erhöht gemessenes CgA und NSE mit einem geringe-

ren Gesamtüberleben verbunden (100, 101)

SSA wie Octreotid sind eine Standardtherapie bei einem serotonin-bedingten Karzinoid-syndrom zur Symptomkontrolle, stellt aber oftmals auch eine Option bei niedrigmalignen nonfunktionellen NEN zur Tumorstabilisierung dar (1, 102-105). Gerade in der zweiten Anwendung wären Biomarker zur Auswahl geeigneter Patienten wünschenswert.

Zusammenfassend stellen Biomarker für eine bessere Stratifizierung von NEN Patienten mit Blick auf die zunehmenden Behandlungsoptionen einen dringlichen „medical need“ dar. Zukünftig sollten Biomarker bei der Wahl der Therapie obligatorisch einbezogen werden.

Daher soll der prädiktive Wert von CgA, PIGF und Serotonin für die SSA-Therapie untersucht werden.

3 Patienten und Methoden

3.1 Patienten und Studienablauf

In diese klinische Studie wurden Patienten mit NEN eingeschlossen, die von 2008 bis 2011 Blutproben abgaben und sich in Behandlung in der Medizinischen Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie, Charité Campus Virchow Klinikum befanden. Die Diagnose der NEN wurde mittels histologischer Untersuchung nach international festgelegten Kriterien gesichert. Ferner erfolgte der Studieneinschluss erst nach ausführlicher ärztlicher Aufklärung und schriftlicher Einverständniserklärung seitens der Patienten. Ein Ethikvotum lag vor (EA62/2002 und EA2/064/09).

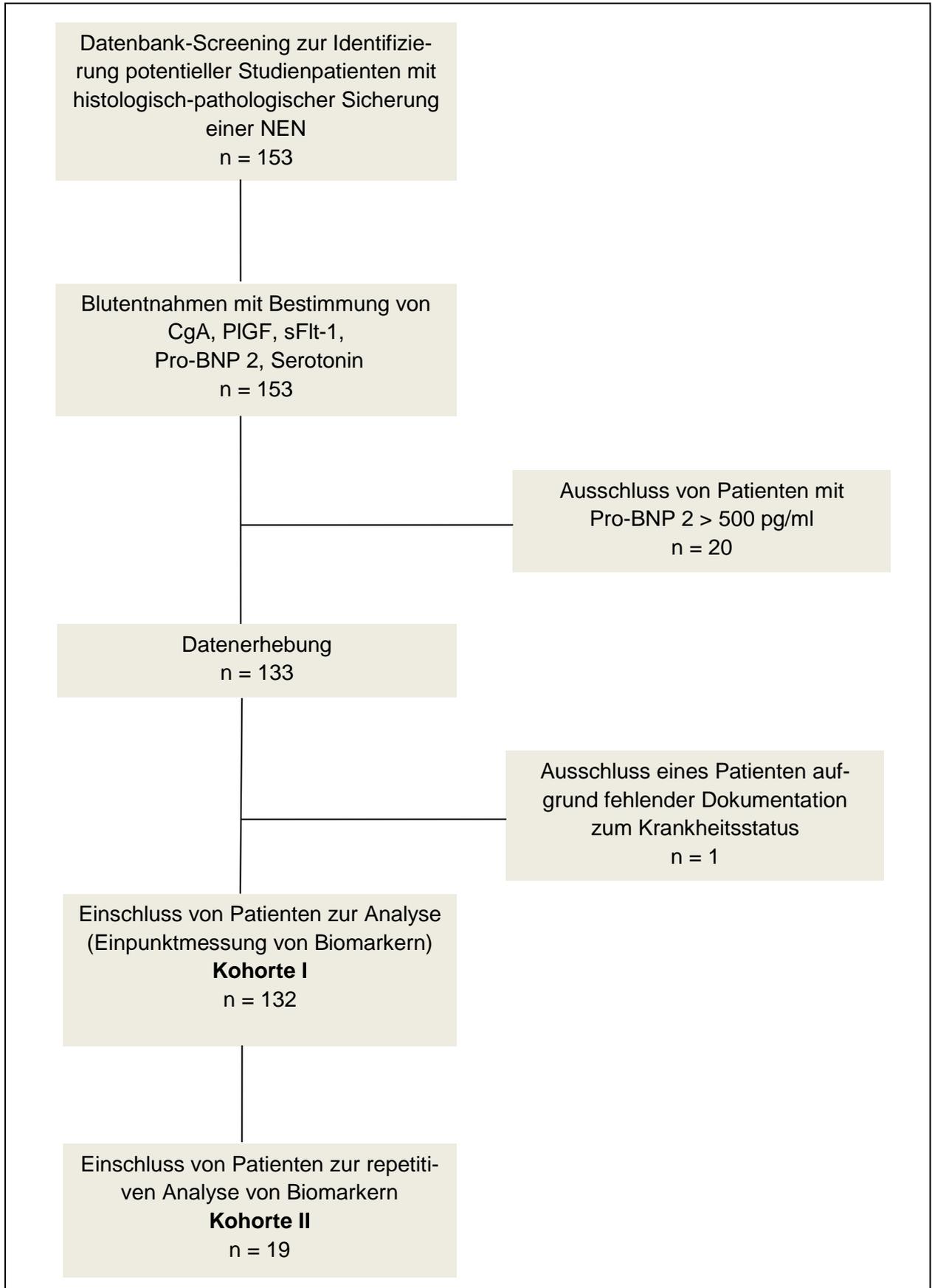
Die Blutentnahme zur Erfassung der Marker CgA, PIGF, sFlt-1 sowie Serotonin erfolgte bei Erstdiagnose oder an einem variablen Tag im Rahmen der regelmäßigen Tumornachsorge bzw. vor, während oder nach der Therapie. Hierzu wurden die Patienten aufgeklärt, im Vorfeld auf serotoninreiche Nahrungsmittel wie zum Beispiel Bananen zu verzichten.

Gleichzeitig wurde mit der Blutabgabe das Pro-BNP 2 (Pro Brain Natriuretic Peptide 2) ermittelt. Um erhöhte PIGF-Werte, die durch eine vorliegende ischämische Kardiomyopathie (ICM) bedingt sind, auszuschließen, wurden Patienten mit Pro-BNP 2-Werten über 500 pg/ml im Folgenden nicht berücksichtigt.

Nach diesen Kriterien konnten insgesamt 132 Patienten in dieser Studie in Kohorte I, wie im Flussdiagramm Tafel 1 zu sehen, eingeschlossen werden. In einer Subpopulation (Kohorte II, n=19) erfolgten repetitive Messungen vor und nach SSA-Therapieeinleitung. An den ersten drei Tagen wurde fünfmal täglich Blut von den Patienten abgegeben, weiterhin wurden, wenn möglich, die Spiegel zur Follow-up-Untersuchung bestimmt. Lediglich ein Patient floss mit weniger als 15 Probenabgaben an den ersten drei Tagen in die Bewertung ein.

Diese zwei Kohorten wurden im Folgenden getrennt voneinander untersucht.

Die Charakteristika der Patienten der Kohorten I und II sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.



Tafel 1: Flussdiagramm zur Identifizierung und Rekrutierung von Patienten in Kohorte I, II

3.2 Erhebung der Patientendaten

Zusammenfassend wurden insgesamt 124 variable Parameter von den in der Studie eingeschlossenen Patienten in einem Erfassungsbogen erstellt, schriftlich dokumentiert und später in einer Datenbank in dem Programm IBM SPSS Statistics (Version 21) zusammengeführt.

Dazu wurden einerseits Epikrisen von den Patienten mit dokumentierten Befunden z.B. bildgebender Verfahren wie Sonographie, Computertomographie, auch Gallium-68-DOTATOC-Computertomographie, Magnetresonanztomographie, Octreotid- und Knochenszintigraphie, sowie Operationsberichte mit nachfolgender pathologisch anatomischer Begutachtungen herangezogen.

Zu den Basisvariablen gehörten demographische Daten, Charakterisierung des Tumors, Resektionsstatus, Tumorverlauf und Therapie.

In den Verlaufsparemtern wurden Laborparameter und nachfolgende Änderungen bezüglich des Tumorstadiums mit neuauftretener Metastasierung sowie eine Änderung der Therapie erfasst.

3.3 Kontrollkollektiv

In dieser Studie gab es zur Erfassung von Referenzwerten zwei Kontrollgruppen.

Von der Kontrollgruppe I wurden CgA und von der Kontrollgruppe II PIGF und sFlt-1 von Gesunden gemessen.

3.4 Bestimmung von Tumormarkern

3.4.1 Bestimmung von CgA

Die Messung von CgA erfolgte durch Assays verschiedener Firmen (DAKO GmbH, Thermo Fisher Scientific B·R·A·H·M·S GmbH, CIS bio GmbH und Euro Diagnostica AB).

Die genaue Charakteristik der Assays ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Charakteristika kommerzieller Immunoassays für Chromogranin A (44, 59)

Firma	DAKO GmbH	Thermo Fisher Scientific B·R·A·H·M·S GmbH	CIS bio GmbH	Euro Diagnostica AB
Assay	DAKO ELISA KIT (106)	KRYPTOR (107)	CIS bio-RIACT (108, 109)	EURIA (110)
Methode	Sandwich-ELISA	Immunfluoreszenz-assay TRACE™	Sandwich-RIA	RIA, kompetitiv
Antikörper	polyklonal (2) gegen C-terminales 23-kD Fragment	monoklonal (2) gegen AS 250-301 + AS k. A,	monoklonal (2) gegen Kern des Moleküls (145-245) AS 198-245 AS 145-197	polyklonal gegen Fragment AS 116-439
Markierung	Peroxidase	k. A.	¹²⁵ I	¹²⁵ I
Matrix	Humanplasma	Humanserum	Humanserum oder -plasma	Humanserum oder -plasma
Einheit	U/l	ng/ml (µg/l)	ng/ml	nmol/l
Messbereich	5-450	7-1.000.000	1,5-k.A.	k.A.
Cut-off-Wert	18	k.A.	100 Serum 150 Plasma	6
Testzeit	2,5 h	29 min	18 h + 2 h	20-24 h + 30-60 min

[TRACE™: Time-Resolved Amplified Cryptate Emission, AS: Aminosäure, k.A.: keine Angabe]

CgA wurde in dieser Studie im CIS bio-RIACT und im EURIA-Assay im Serum gemessen.

Bei CgA-Messungen, welche mittels DAKO ELISA -Assay durchgeführt wurden, mussten bei Doppelmessungen bei circa 4% starke Abweichungen (50% bis 100% bei Replikatmessungen) registriert werden. Eine Ursache hierfür konnte nicht gefunden werden. Die Proben wurden erneut in einem zweiten unabhängigen Labor mittels DAKO-Assay gemessen, jedoch konnte kein besseres Ergebnis erzielt werden. Weitere Analysen mit dem DAKO-Assay erschienen daher nicht sinnvoll.

3.4.2 Bestimmung von PIGF

Die Bestimmung von PIGF erfolgte im Fremdlabor. Zur quantitativen Messung von PIGF in Humanserum wurde der Elecsys® PIGF Festphasen-Enzymimmunoassay der Firma Roche verwendet. Diese Testmethode nutzt zwei monoklonale Anti-PIGF-Antikörper und eine Streptavidin-Biotin-Verbindung. Die Laufzeit beträgt 18 min (111). Der Messbereich des Assays liegt zwischen 1,06-1000 pg/ml (111) und erfasst die PIGF-Isoform 1 zu 100% und die Isoform 2 zu 28%. [Persönliche Kommunikation mit Roche].

3.4.3 Bestimmung von sFlt-1

Die Bestimmung von sFlt-1 erfolgte im Fremdlabor. Zur quantitativen Erfassung von sFlt-1 in Serum wurde ebenfalls eine immunologische maschinelle Untersuchungsmethode der Firma Roche benutzt. Die Messung erfolgte mittels Sandwich-Assay auf Grundlage der Streptavidin-Biotin-Verbindung mit einem Messbereich von 10-85000 pg/ml (111).

3.4.4 Bestimmung von Pro-BNP 2

Die Pro-BNP 2-Werte wurden in einem Fremdlabor mit einem vollautomatisierten Elektro-Chemolumineszenz-Immunoassays nach Elecsys® der Firma Roche erfasst (112).

3.4.5 Bestimmung von Serotonin

Die Bestimmung von Serotonin erfolgte im Routinelabor. Mit Hilfe von Hochleistungsflüssigkeitschromatographen wurde in dieser Studie Serotonin in Plasma (EDTA, Platelet poor) ermittelt und in ng/l angegeben.

3.5 Auswertung und Statistik

Die statistische Auswertung der o.g. Patientendaten wurde unter Verwendung der Datenanalyseprogramme SPSS (Version 21) und GraphPad Prism (Version 5) generiert.

Um die Testgüte der verschiedenen CgA-messenden Assays zu ermitteln, wurden jeweils die Sensitivität sowie die Spezifität bestimmt. Dazu wurden die Anzahl der Patienten und gesunden Kontrollen gezählt, deren gemessenen Werte ober- und unterhalb des berechneten Referenzwertes lagen, sowie anschließend in einer Vierfeldertafel ins Ver-

hältnis zueinander gesetzt.

Die genaue Berechnung der einzelnen Gütevariablen kann der Tafel 2 entnommen werden.

	Krankheit	Gesundheit	
CgA pathologisch	a	b	a + b
CgA normwertig	c	d	c + d
	a + c	b + d	
Sensitivität = $\frac{a}{a+c}$ Spezifität = $\frac{d}{b+d}$			

Tafel 2: Anfertigung der Vierfeldertafel und Berechnung von Sensitivität und Spezifität

Zudem wurde der Versuch unternommen eine direkte Vergleichbarkeit der Assays herzustellen. Hierzu wurden die Mittelwerte der jeweiligen Assays berechnet. Anschließend erfolgte zur Ermittlung eines Vergleichskoeffizienten (CgA/Mittelwert) die Division des errechneten Mittelwertes durch die jeweiligen Messwerte.

Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit deskriptive und explorative Datenanalysen angewandt.

Bei den explorativen Analysen wurden die Variablen je nach Fragestellung in Gruppen eingeteilt und in Streudiagrammen bzw. in Box- und Whisker-Plots vergleichend gegenübergestellt. Die graphischen Darstellungen in Box- und Whisker-Plots bilden dabei (von unten nach oben sortiert) 25-, Median und 75-Perzentile ab. Für den Vergleich der Gruppen und die Berechnung der statistischen Unterschiedlichkeit wurden der Mann-Whitney-U-Test oder der Kruskal-Wallis-Test für nichtparametrische und unverbundene Stichproben herangezogen. Als statistisch signifikant wurde eine Disparität ab einem Signifikanzwert (p) von kleiner als 0,05 definiert und dementsprechend angegeben.

Zur Evaluierung des diagnostischen Potentials wurden Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurvenanalysen von NEN-Erkrankten und gesunden Probanden durchgeführt und die AUC (Area Under the Curve) bestimmt.

Ferner wurden die Biomarker mit dem Tumorverhalten verglichen. Aufgrund des langen Überlebens von NEN-Patienten war eine Korrelation der Höhe des Tumormarkers mit dem Überleben nicht möglich. Daher erfolgten Analysen hinsichtlich der Zeit bis zur Tumorprogression unter Zugrundelegung von Kaplan-Meier-Kurven. Dabei wurde als Beobachtungszeit der Zeitraum zwischen dem Datum der ersten Blutentnahme und ei-

nem Progress im Verlauf (TTP) bzw. bei stabiler Tumorerkrankung das Ausscheiden des Patienten aus der Beobachtung definiert. Die Beobachtung endete im August 2013. Darüber hinaus erfolgte eine multivariate Analyse mittels Cox-Regressionsanalyse, in der Co-Variablen eingeschlossen und mittels Log-Rank getestet wurden, die einen potentiellen Risikofaktor hinsichtlich der Zeit bis zur Tumorprogression darstellten. Der prognostische Wert wurde durch die Likelihood Ratio beurteilt. Alle durchgeführten Analysen waren zweiseitig.

Ferner erfolgten dynamische Untersuchungen der Biomarker. Hierbei wurde die Darstellung der gemessenen Biomarker über die Zeit gewählt. In den Kurzzeitanalysen wurden fünf Blutentnahmen pro Tag über drei Tage entnommen. So entsprachen die Blutentnahmen 1 bis 5, die am Tag 0 entnommenen fünf Serumentnahmen ohne SSA-Medikation, nummeriert in der Reihenfolge der Abnahme. In Analogie dazu konnten die Blutentnahmen 6 bis 10 dem Tag 1 der SSA-Medikation und die Blutentnahmen 11 bis 15 dem Tag 2 der SSA-Medikation zugeordnet werden. Im Langzeitverlauf erfolgte die Messungen am Tag 0 und 14, sowie nach 1 und 2 Monaten nach Therapiebeginn mit SSA. Darauf aufbauend erfolgten Untersuchungen hinsichtlich des prädiktiven Wertes von Biomarkern nach SSA-Therapie-Einleitung durch TTP-Analysen nach Kaplan-Meier.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der Patientenkohorten im Vergleich zu gesunden Probanden

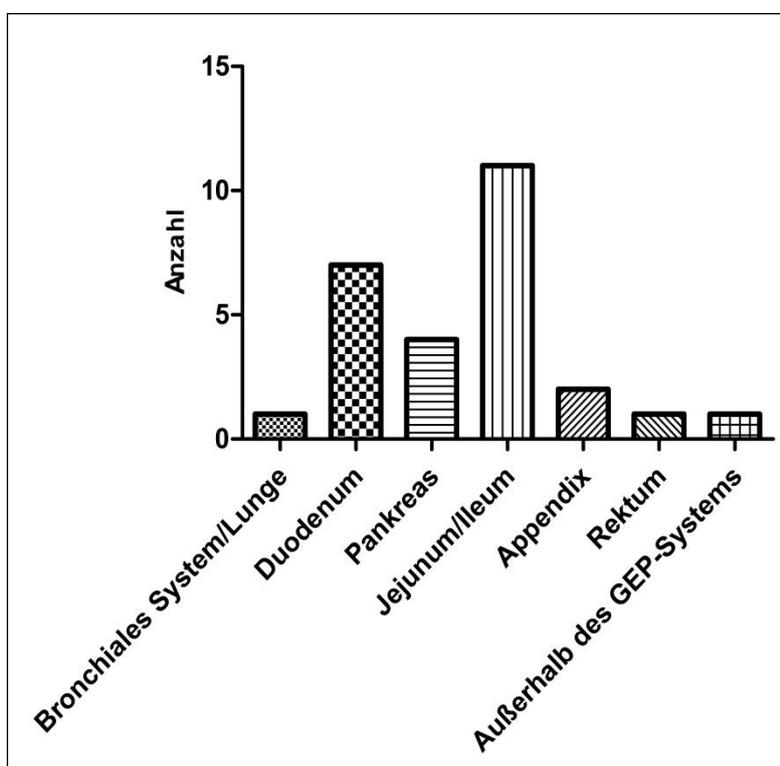
4.1.1 Charakterisierung des Patientenguts der Kohorte I

Insgesamt wurden Blutproben von 132 Patienten, davon 57 männlichen und 75 weiblichen Geschlechts, gesammelt. Im Durchschnitt waren die Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose 56 Jahre alt, das Minimal- und Maximalalter lag zwischen 20 und 82 Jahren. Der Primärtumor befand sich bei 53 Patienten im Foregut, davon wiesen drei Patienten eine hereditäre Erkrankung im Rahmen eines MEN-1-Syndroms auf. Bei 62 weiteren Patienten befand sich die Neoplasie im Midgut und nur vier Patienten hatten eine Neoplasie im Hindgut. Des Weiteren zeigten vier Patienten eine NEN außerhalb des gastroenteropankreatischen Systems. In neun Fällen konnte die Primärtumorlokalisation trotz intensiver Diagnostik nicht eruiert werden (Cancer of Unknown Primary, CUP). Genaue Informationen über die Primärtumorlokalisationen sind in der Tabelle 2 dokumentiert.

Tabelle 2: Übersicht über Primärtumorlokalisationen

Primarius	Anzahl	Prozentualer Anteil am Gesamtkollektiv
Foregut		
Bronchiales System/Lunge	2	1,5%
Magen	6	4,5%
Duodenum	10	7,5%
Pankreas	32	24,8%
MEN-1	3	2,3%
Midgut		
Jejunum/Ileum	55	41,4%
Appendix	3	2,3%
Zökum	4	3,0%
Hindgut		
Rektum	4	3,0%
Außerhalb des GEP-Systems		
	4	3,0%
CUP		
	9	6,7%

Des Weiteren wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme 27 Patienten der Kohorte I als tumorfrei eingestuft. Als Kriterien für bestehende Tumorfreiheit wurden festgelegt: Eine chirurgische Entfernung des Tumors mit mikroskopischem Nachweis tumorfreier Schnittränder und makroskopischer Ausschluss lokoregionaler Tumorreste bzw. Metastasen. Weiter wurde gefordert, dass zum Zeitpunkt der Blutentnahme bildgebende Untersuchungen wie eine Computertomographie oder einer Kernspintomographie Tumorfreiheit bildmorphologisch bestätigten und klinisch keine tumorbedingte Symptomatik vorlag. Die genaue Zuordnung der tumorfreien Patienten nach Primarius ist der Abbildung 2 zu entnehmen.



Es bestand eine Tumorfreiheit bei sieben duodenalen, vier pankreatischen sowie bei elf jejunoilealen und bei zwei Appendix-NEN. Weiter wurden jeweils ein Patient mit bronchialer, ein weiterer mit rektaler Neoplasie sowie ein Patient mit Neoplasie außerhalb des GEP-Systems als tumorfrei dokumentiert.

Abbildung 2: Tumorfreiheit nach Zuordnung des Primarius

Die Tabelle 3 gibt genaue Informationen über die Häufigkeitsverteilung der Primärtumorlokalisationen der 105 Patienten mit bestehender aktiver Tumorerkrankung wieder.

Tabelle 3: Häufigkeitsverteilung der Primariuslokalisation bei bestehender Tumorerkrankung

	Primarius	Anzahl	Prozentualer Anteil am Gesamtkollektiv
Foregut	Bronchiales System/Lunge	1	1,0%
	Magen	6	5,7%
	Duodenum	3	2,9%
	Pankreas	28	26,7%
Midgut	Jejunum/Ileum	44	41,9%
	Appendix	1	1,0%
	Zökum	4	3,8%
Hindgut	Rektum	3	2,8%
MEN-1		3	2,8%
Außerhalb des GEP-Systems		3	2,8%
CUP		9	8,6%

Die folgenden Darstellungen beziehen sich auf Patienten, welche zum Zeitpunkt der Blutabgabe nicht als tumorfrei eingestuft wurden.

Knapp 40% der Patienten wiesen ein Hypersekretionssyndrom meist in Form eines Karzinoidsyndroms auf. Bei einem Patienten wurde eine eventuelle Funktionalität nicht ausreichend dokumentiert.

Hinsichtlich des Gradings waren von den Primärtumoren mehr als 90% gut bis mäßig differenziert (G1- und G2-NEN), bei ca. 7% lag eine schlechte Differenzierung (G3-NEN) vor. Die Tumorstadien wurden nach der WHO-Klassifikation eingeteilt. Bei 93 Patienten lag ein Stadium IV der Tumorerkrankung vor, nur 13 Patienten wiesen das Tumorstadium I-III auf. Bezogen auf die Metastasierungslokalisation zeigten 79 Patienten Lebermetastasen zum Zeitpunkt der Blutabnahme, wobei sogar 34 Patienten davon weitere extrahepatische Filiae boten. Von den 105 erkrankten Patienten waren 76 Patienten medikamentös vorbehandelt, 29 Patienten waren therapienaiv.

Eine tabellarische Übersicht über das Kollektiv I gibt Tabelle 4 wieder.

Tabelle 4: Charakteristika der Patientenkohorte I mit bestehender Tumorerkrankung

	Anzahl	Prozentualer Anteil am Gesamtkollektiv
Grading		
G1	40	38,1%
G2	57	54,3%
G3	07	6,7%
unbekannt	01	0,9%
Funktionalität		
Karzinoid	36	34,3%
Gastrinom	06	5,7%
VIPom	02	1,9%
Insulinom	01	0,9%
Glukagonom	02	1,9%
ECLom	02	1,9%
nonfunktionell	55	52,4%
unbekannt	01	0,9%
Tumorstadium		
I-III	13	12,4%
IV	92	87,6%
Metastasierung		
hepatisch	45	44,1%
extrahepatisch	13	12,7%
hepatisch/extrahepatisch	34	33,3%
Vorbehandlung		
	76	72,4%

Die Verteilung der Messwerte für CgA-, PIGF-, sFlt-1-Spiegel im Gesamtkollektiv zeigt Tabelle 5.

Tabelle 5: Werteverteilung von CgA, PIGF und sFlt-1 des Patientenkollektivs I

	Minimum	25. Perzentile	Median	75. Perzentile	Maximum
CgA					
CIS bio-RIACT	47,61 ng/ml	71,50 ng/ml	143,60 ng/ml	527,70 ng/ml	10369,20 ng/ml
EURIA	2,80 nmol/l	4,95 nmol/l	7,80 nmol/l	19,00 nmol/l	327,20 nmol/l
KRYPTOR	14,01 ng/ml	69,12 ng/ml	148,40 ng/ml	508,80 ng/ml	9876,00 ng/ml
PIGF					
	5,08 pg/ml	13,23 pg/ml	16,27 pg/ml	20,40 pg/ml	66,62 pg/ml
sFlt-1					
	13,60 pg/ml	69,53 pg/ml	78,95 pg/ml	87,15 pg/ml	721,30 pg/ml

4.1.2 Charakterisierung des Patientenguts mit dynamischen Messungen (Kohorte II)

Das Patientenkollektiv der Kohorte II umfasst 19 Patienten, zusammengesetzt aus 13 Männern und sechs Frauen. Der Altersdurchschnitt zum Zeitpunkt der Erstdiagnose konnte mit 56 Jahren beziffert werden, wobei die Spanne von 39 bis 72 Jahre reichte. Von den insgesamt 19 Patienten wiesen 16 den Primärtumor im Ileum auf, drei weitere Patienten hatten einen Tumor im Bereich des Pankreas. In 15 von 19 Fällen konnte ein Karzinoidsyndrom nachgewiesen werden.

Bezüglich der histologischen Gradeinteilung trennte sich diese Kohorte zu 53% in G1 und zu 47% in G2-Neoplasien. Zur Zeit der Blutentnahme waren 18 Patienten im Stadium IV, nur ein Patient wies lokoregionale Lymphknotenfiliae auf.

Über 80% dieses Patientenkollektiv war therapienaiv.

Eine tabellarische Übersicht der Patientencharakteristika der Kohorte II ist in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6: Übersicht von Patientenkohorte II

Pat.-Nr.	Geschlecht	Primärtumorlokalisation	Grading	Funktionalität	TNM	Metastasierung	Vorbehandlung
01	männlich	Ileum	G2	Karzinoidsyndrom	4	hepatisch	ja
02	weiblich	Ileum	G1	Karzinoidsyndrom	4	extra- /hepatisch	nein
03	männlich	Ileum	G1	Karzinoidsyndrom	4	extra-/hepatisch	nein
04	weiblich	Ileum	G1	Karzinoidsyndrom	4	extra- /hepatisch	ja
05	männlich	Ileum	G2	Karzinoidsyndrom	4	hepatisch	nein
06	männlich	Ileum	G1	Karzinoidsyndrom	4	hepatisch	nein
07	männlich	Pankreas	G2	Karzinoidsyndrom	4	hepatisch	nein
08	männlich	Ileum	G1	Karzinoidsyndrom	4	extra- /hepatisch	nein
09	weiblich	Pankreas	G2	Glukagonom	3b	lokoregional	nein
10	männlich	Ileum	G2	Karzinoidsyndrom	4	extra- /hepatisch	nein
11	männlich	Ileum	G2	Karzinoidsyndrom	4	hepatisch	nein
12	männlich	Ileum	G2	Karzinoidsyndrom	4	hepatisch	nein
13	männlich	Ileum	G1	Karzinoidsyndrom	4	extra- /hepatisch	ja
14	männlich	Ileum	G1	Karzinoidsyndrom	4	extra- /hepatisch	nein
15	männlich	Ileum	G1	Karzinoidsyndrom	4	extrahepatisch	nein
16	weiblich	Pankreas	G2	nonfunktionell	4	hepatisch	nein
17	weiblich	Ileum	G1	nonfunktionell	4	extra- /hepatisch	nein
18	weiblich	Ileum	G2	nonfunktionell	4	extrahepatisch	nein
19	männlich	Ileum	G1	Karzinoidsyndrom	4	hepatisch	nein

4.1.3 Charakterisierung gesunder Probanden

Zur Generierung von Referenzwerten erfolgten Messungen von gesunden Probanden, vom Kontrollkollektiv I für CgA und vom Kontrollkollektiv II für PLGF und sFlt-1.

Das Kontrollkollektiv I setzte sich aus 123 Normalpersonen, davon 64 Männer und 59 Frauen, zusammen. Das Durchschnittsalter lag bei 55 Jahren und zeigte eine Breite von 50 bis 61 Jahren.

Aus 87 gesunden Probanden (29 Männer, 58 Frauen) bestand das Kontrollkollektiv II. Im Durchschnitt waren die Normalpersonen 45,6 Jahre alt (24-56 Jahre). Zum Zeitpunkt der Blutentnahme war bei keinem der Probanden eine endokrine Erkrankung bekannt. Von den weiblichen Probanden wurde anamnestisch insbesondere eine Schwangerschaft verneint.

Die Tabelle 7 gibt einen Überblick über die Werteverteilung.

Tabelle 7: Werteverteilung von CgA, PIGF und sFlt-1 bei Gesunden

	Minimum	25. Perzentile	Median	75. Perzentile	Maximum
CgA					
CIS bio-RIACT	12,06 ng/ml	42,20 ng/ml	52,12 ng/ml	64,27ng/ml	96,67 ng/ml
EURIA	2,50 nmol/l	4,10 nmol/l	4,61 nmol/l	5,15 nmol/l	7,45 nmol/l
KRYPTOR	12,59 ng/ml	37,06 ng/ml	48,73 ng/ml	59,72 ng/ml	83,66 ng/ml
PIGF	3,84 pg/ml	12,05 pg/ml	12,30 pg/ml	23,22 pg/ml	27,79 pg/ml
sFlt-1	53,4 pg/ml	65,1 pg/ml	73,1pg/ml	78,8 pg/ml	109,3 pg/ml

4.2 Chromogranin A

Folgende Analysen beziehen sich auf tumortragende Patienten mit NEN, wenn nicht explizit tumorfreie Patienten in den Analysen benannt sind.

4.2.1 Testgüte von CgA-Assays

Nachfolgend wurde CgA durch verschiedene Messmethoden sowohl bei erkrankten Personen mit NEN als auch bei Gesunden bestimmt. Anhand der CgA-Werte der Kontrollgruppe und der NEN-erkrankten Kohorte wurden mithilfe von ROC-Analysen die Grenzwerte für den CIS bio-RIACT-, EURIA- und KRYPTOR-Assay berechnet. Tabelle 8 gibt die ermittelten Grenzwerte, die AUC und das 95%-Konfidenzintervall wieder.

Tabelle 8: ROC-Analysen nach verwendetem CgA-Assay

Assay	Grenzwert	AUC	95%-Konfidenzintervall	p-Wert
CIS bio-RIACT	91,4 ng/ml	0,9095	0.8685-0.9505	< 0.0001
EURIA	6,6 nmol/l	0,8566	0.8001-0.9131	< 0.0001
KRYPTOR	83,2 ng/ml	0,8873	0.8369-0.9378	< 0.0001

Anhand der ermittelten Grenzwerte wurden die Sensitivitäten und Spezifitäten der verschiedenen Messmethoden berechnet und nachfolgend in Tabelle 9 wiedergegeben.

Tabelle 9: Gütevariablen nach verwendetem CgA-Assay

Assay	Grenzwert	Sensitivität	Spezifität
CIS bio-RIACT	91,4 ng/ml	77%	99%
EURIA	6,6 nmol/l	70%	99%
KRYPTOR	83,2 ng/ml	77%	98%

Anschließend erfolgte die Berechnung der Sensitivität der Messmethoden unter Berücksichtigung der Primärtumorlokalisation.

Tabelle 10 gibt den relativen Anteil der Patienten mit erhöhten CgA-Spiegeln der drei Messmethoden mit Zuordnung zum Primärtumor wieder.

Tabelle 10: Relativer Anteil erhöhter CgA-Spiegel, eingeteilt nach dem Primarius

	CIS bio-RIACT	EURIA	KRYPTOR
Grenzwert	91,4 ng/ml	6,6 nmol/l	83,2 ng/ml
Foregut	0,80	0,71	0,80
Pankreas	0,79	0,71	0,79
Midgut	0,73	0,71	0,73
Jejunum/Ileum	0,73	0,72	0,73
Hindgut	0,50	0,50	0,50

Im Folgenden wurde der Versuch unternommen eine direkte Vergleichbarkeit der Assays durch Ermittlung eines Vergleichskoeffizienten herzustellen. Ein Auszug dieses Vergleichs wird in der Tabelle 11 wiedergegeben.

Tabelle 11: Auszug eines Vergleichs der CgA-Assays durch Ermittlung eines Vergleichskoeffizienten k

	KRYPTOR		CIS bio-RIACT		EURIA	
	CgA in ng/ml	CgA/ Mittelwert	CgA in ng/ml	CgA/ Mittelwert	CgA in nmol/l	CgA/ Mittelwert
	534,50	1,30	530,97	1,40	16,52	0,90
	90,41	0,22	91,46	0,24	6,21	0,34
	9876,00	24,04	10369,20	27,25	327,20	17,82
	165,40	0,40	130,99	0,34	7,31	0,40
	2200,00	5,36	2730	7,17	85,2	4,64
	80,55	0,20	87,80	0,23	6,29	0,34
	83,44	0,20	94,87	0,25	4,80	0,26
	53,68	0,13	69,05	0,18	3,12	0,17
	347,10	0,85	319,85	0,84	18,6	1,01
	80,55	0,20	87,80	0,23	6,29	0,34
	
Mittelwert	410,73		380,58		18,36	

Hierbei zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen den Vergleichskoeffizienten (CgA/Mittelwert) des KRYPTOR- und CIS bio-RIACT-Assays. Dieses Ergebnis bestätigte sich in der Korrelationsanalyse nach Spearman. Zwischen dem KRYPTOR- und CIS bio-RIACT- Assays wurde ein hochsignifikanter, hoher linearer Zusammenhang nachgewiesen (Abbildung 3).

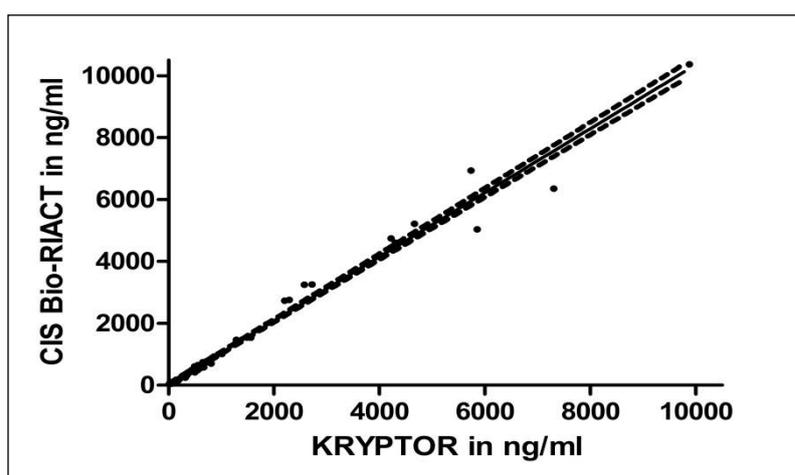


Abbildung 3: Korrelationsanalyse der CgA-Werte des KRYPTOR- und CIS bio-RIACT-Assays bei Patienten mit NEN

Zu sehen ist eine hochsignifikante, hohe lineare Korrelation (r) ($r=0,99$; $p<0,0001$).

Ein Vergleich der Sensitivitäten und Spezifitäten verschiedener Studien von Stridsberg et al. (59), Ferrari et al. (113), Zatelli et al. (114) und Belli et al. (115) hinsichtlich der untersuchten Testmethode wird in Tabelle 12 und 13 dargestellt.

Tabelle 12: Vergleich Sensitivitäten und Spezifitäten von CgA (CIS bio-RIACT-Assay) verschiedener Studien

CIS bio-RIACT	Stridsberg et al.	Ferrari et al.	Zatelli et al.	Eigene Studie	
	Gesicherte NEN	46	93	81	103
	Gesunde Probanden	26		129	123
	Grenzwert in ng/ml	< 99	< 70	< 53	< 91,4
	Sensitivität	67%	79%	78%	77%
	Spezifität	96%	64%	71%	99%

Tabelle 13: Vergleich Sensitivitäten und Spezifitäten von CgA (EURIA-Assay) verschiedener Studien

EURIA	Stridsberg et al.	Belli et al.	Eigene Studie	
	Gesicherte NEN	46	119	102
	Gesunde Probanden	26	39	123
	Grenzwert in nmol/l	< 4	< 2,8	< 6,6
	Sensitivität	93%	92,3%	70%
	Spezifität	88%	100%	99%

Insgesamt scheinen der CIS bio- und der KRYPTOR- Assay in der hiesigen Studie robuste Methoden zur Messung von CgA darzustellen, nicht zuletzt aufgrund stabiler Messergebnisse sowie einer hohen Sensitivität und Spezifität. Aufgrund der automatisierten Handhabung besitzt der KRYPTOR-Assay einen Vorteil bezüglich der Messzeit (29 min versus 18 h) und damit der Effizienz.

Nachfolgend wurden zur Evaluierung des prognostischen und prädiktiven Potentials von CgA Messungen die Ergebnisse des KRYPTOR-Assays herangezogen.

4.2.2 Univariate Datenanalysen von CgA

4.2.2.1 CgA-Spiegel von Patienten mit NEN im Vergleich zu tumorfreien und gesunden Probanden

Patienten mit neuroendokriner Tumorerkrankung hatten signifikant höhere CgA-Werte im Vergleich zum Kontrollkollektiv und zu tumorfreien Patienten. Auch bei tumorfreien Patienten lagen im Vergleich zur Kontrollkohorte erhöhte CgA-Werte vor (Abbildung 4).

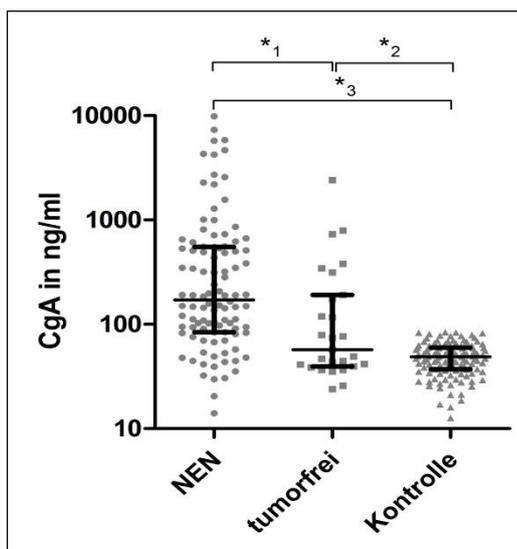


Abbildung 4: Erhöht gemessene CgA-Werte bei Patienten mit NEN versus tumorfreie Patienten und der Kontrollkohorte, als auch bei tumorfreien Patienten versus der Kontrollkohorte

Dargestellt sind Scatter Dot-Plots mit Median und Interquartilbereich von NEN-Patienten (n=103), tumorfreien Patienten (n=27) und der Kontrollkohorte (n=123), (*1 $p \leq 0,001$, NEN vs. tumorfrei; *2 $p \leq 0,05$ tumorfrei vs. Kontrolle, *3 $p \leq 0,001$ NEN vs. Kontrolle), Kruskal-Wallis-Test.

4.2.2.2 CgA-Spiegel von Patienten mit NEN nach der Primärtumorlokalisation

Zwischen den einzelnen Primärtumorlokalisationen ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der Höhe von CgA. Der Kruskal-Wallis Test bestätigte dies mit einem Signifikanzwert von 0,839. Die hiesige Auswertung wird in der Abbildung 5 graphisch dargestellt.

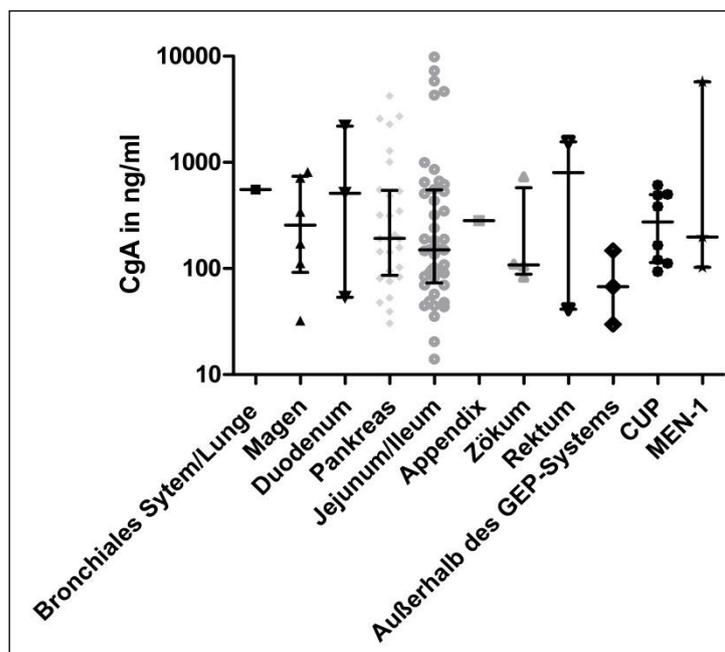


Abbildung 5: CgA-Werte von Patienten mit NEN nach unterschiedlicher Primärtumoralokalisation im Vergleich

Dargestellt sind Scatter Dot-Plots mit Median und Interquartilbereich von Patienten mit Primum im bronchialen System/Lunge (n=1); Magen (n=6); Duodenum (n=3); Pankreas (n=28); Jejunum/Ileum (n=44); Appendix (n=1); Zökum (n=4); Rektum (n=2); außerhalb des GEP-Systems (n=3); CUP (n=8); MEN-1 (n=3), $p=0,839$; nicht signifikant (n.s.), Kruskal-Wallis-Test.

4.2.2.3 CgA-Spiegel bei Midguttumoren mit und ohne Karzinoidsyndrom

Von 49 Patienten mit Midguttumoren wiesen 34 Patienten eine endokrine Symptomatik im Sinne eines Karzinoidsyndroms auf. Eine Korrelation der Höhe von CgA in Bezug auf eine vorliegende funktionelle Aktivität bei Midguttumoren konnte mittels Mann-Whitney-U-Test ($p=0,820$; n.s.) nicht belegt werden.

13 von 34 Patienten mit Karzinoidsyndrom waren zudem an einer Herzinsuffizienz durch eine Endokardfibrose erkrankt. Nach Auswertung konnte kein Unterschied hinsichtlich der Höhe von CgA bei Midguttumorpatienten mit und ohne karzinoidbedingter Kardiomyopathie im Test nach Mann und Whitney ($p=0,804$; n.s.) ermittelt werden.

4.2.2.4 CgA-Spiegel von Patienten mit NEN mit unterschiedlichem Grading

Hinsichtlich des Gradings waren die CgA-Spiegel nicht signifikant different in der Höhe im Kruskal-Wallis-Test ($p=0,786$; n.s.). Gleichwohl zeigten Patienten mit zunehmendem Grading im Median tendenziell ansteigende CgA-Werte (G1-Median: 151,2 ng/ml, G2-Median: 192,6 ng/ml, G3-Median: 341,7 ng/ml).

Die Kriterien der Gradzuordnung werden in der Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Kriterien der Gradzuordnung nach der WHO (34)

		Mitosen (10HPF)	Ki-67 Index (%)
Grading	G1	< 2	< 3
	G2	2 - 20	3 - 20
	G3	> 20	> 20

4.2.2.5 CgA-Spiegel von Patienten mit NEN im Tumorstadium I-III und IV

Aufgrund der sonst zu kleinen Fallzahlen wurden die Tumorstadien I bis III zusammengefasst.

In beiden Gruppen I-III und IV zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Höhe der CgA-Spiegel im Mann-Whitney-U-Test ($p=0,555$; n.s.).

Ebenso konnten keine Unterschiede in der Höhe der CgA-Werte bei Patienten mit differenter Art der Fernmetastasierung ($p= 0,176$; n.s.) registriert werden, wobei hepatische Filiae im Vergleich zu extrahepatischen Filiae tendenziell höhere CgA-Werte aufwiesen.

4.2.2.6 CgA-Spiegel von Patienten mit NEN unter Berücksichtigung des Remissionsstatus

Die Remission bewertet das Verhalten einer Neoplasie im Therapie- oder Spontanverlauf, zuletzt benannt auch als Response-Evaluation. Hierbei erfolgte die Einteilung nach den RECIST-Kriterien 1.1 („Response Evaluation Criteria In Solid Tumors“), wobei eine progressive Erkrankung (PD) vorliegt, wenn die Summe der Durchmesser einzelner Metastasen beispielsweise in der Leber innerhalb eines definierten Zeitraums um mindestens 20% zunimmt beziehungsweise wenn eine neue Läsion auftritt. Eine stabile Erkrankung (SD) dagegen liegt vor, wenn der Primarius und, oder einzelne Läsionen innerhalb eines definierten Zeitraums um weniger als 30% ab- oder um weniger als 20% zunehmen (116, 117).

Die Tabelle 15 liefert eine Übersicht der CgA-Werte oberhalb beziehungsweise unterhalb des Grenzwertes 83,2 ng/ml in Bezug auf den Remissionsstatus PD versus SD.

Patienten mit aktivem Krankheitsprogress zum Zeitpunkt der Blutentnahme wiesen mehrheitlich CgA-Spiegel über 83,2 ng/ml auf, Patienten mit stabiler Erkrankung nur in

der Hälfte der Fälle. Mittels Mann-Whitney-U-Test wurde eine Signifikanz beim Vergleich der CgA-Werte mit Remissionsstatus SD und PD mit einem P-Wert von 0,062 verfehlt.

Tabelle 15: Remissionsstatus (PD, SD) in Bezug auf CgA-Wert < und > 83,2 ng/ml

	PD	SD
CgA		
< 83,2 ng/ml	1	20
> 83,2 ng/ml	23	42

4.2.2.7 CgA-Spiegel von Patienten mit NEN in Abhängigkeit von der Therapie

Es erfolgte ein Vergleich unterschiedlicher Therapieregimes SSA, Chemotherapie versus keine Therapie bezüglich der Höhe von CgA-Spiegeln. Hierbei zeigten Patienten, die eine Chemotherapie erhielten, im Vergleich zu Patienten ohne Therapie signifikant erhöhte CgA-Spiegel im Kruskal-Wallis-Test ($p=0,044$). Zwischen therapienaiven und SSA-therapierten Patienten ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der Höhe von CgA. Dieser Vergleich wird in der Abbildung 6 graphisch dargestellt.

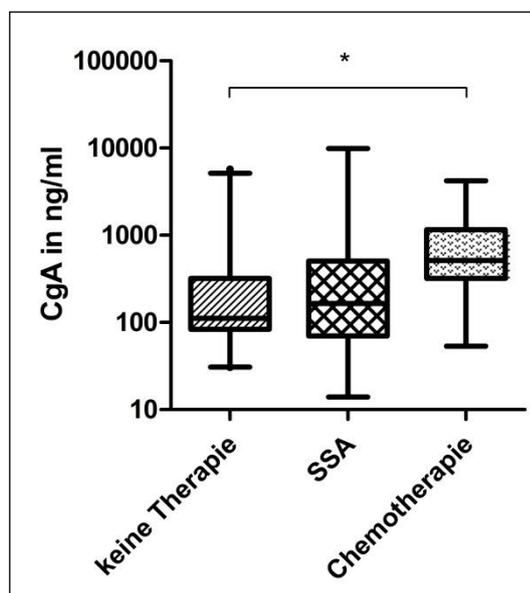


Abbildung 6: CgA-Spiegel abhängig von der durchgeführten Therapie zum Zeitpunkt der Blutentnahme (keine Therapie, SSA, Chemotherapie)

Gezeigt sind Box-Whisker-Plots mit Median von 112,0 ng/ml bei therapienaiven Patienten ($n=47$), von 165,4 ng/ml bei Patienten, die mittels SSA behandelt wurden ($n=39$), und von 492,5 ng/ml bei Chemotherapie-behandelten Patienten ($n=11$) mit Interquartilbereich, (* $p=0,044$, keine Therapie vs. Chemotherapie; $p>0,05$ n.s., keine Therapie vs. Chemotherapie), Kruskal-Wallis-Test.

4.2.3 Verlaufsuntersuchungen von CgA

4.2.3.1 Kurzzeit-Verlaufsuntersuchungen von CgA

In der Patientenkohorte II erfolgten von insgesamt 19 Patienten repetitive Messung vor und nach SSA-Therapie-Einleitung im Kurzzeitverlauf über drei Tage. Als ein signifikanter Abfall wurde eine mindestens 30%ige Reduzierung des Basalwertes am Tag 2 nach SSA-Therapieaufnahme definiert. In der Auswertung der Abbildungen 7-10 wurde deutlich, dass die CgA-Werte im Tagesverlauf gewissen Schwankungen unterworfen sind. Dies war auch ohne therapeutischen Einfluss zu beobachten. So zeigten am Tag 0 ohne SSA-Applikation beispielsweise der Patient 05 eine Variationsbreite der Spiegel von 203,0 ng/ml bis 294,1 ng/ml und der Patient 18 von 354,5 ng/ml bis 466,1 ng/ml. Bei elf von 19 Patienten konnte nach subkutaner SSA-Injektion im Kurzzeitverlauf ein Absinken der CgA-Werte um mehr als 30% registriert werden. Nur ein Patient (Patient 06) wies unter SSA-Therapie steigende CgA-Werte auf.

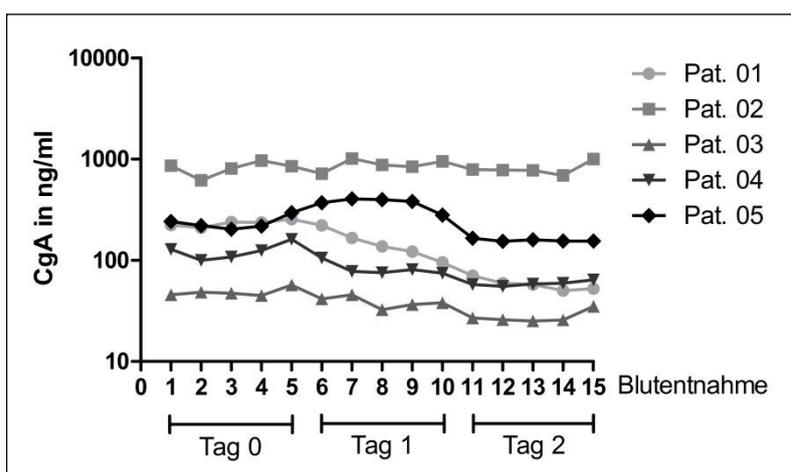


Abbildung 7: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 01-05

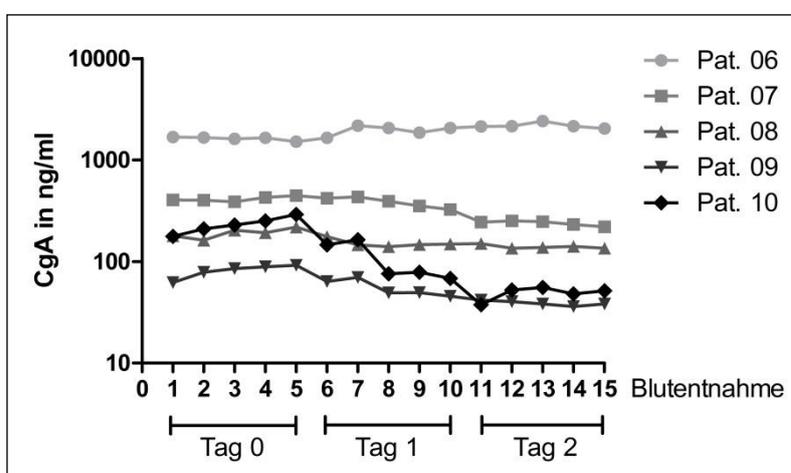


Abbildung 8: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 06-10

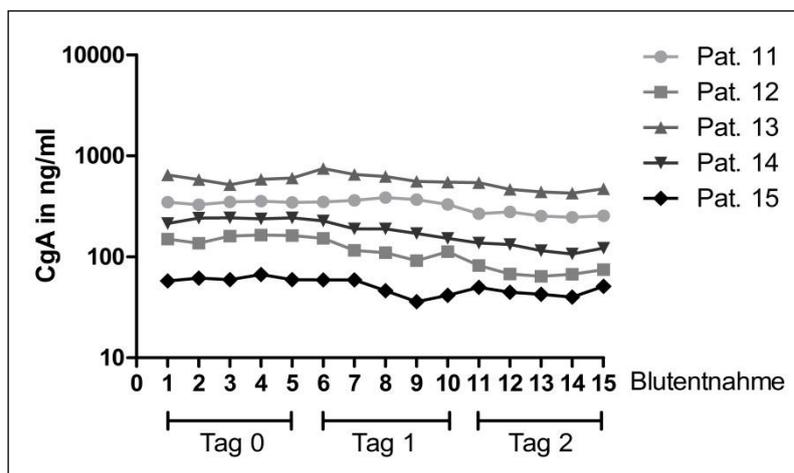


Abbildung 9: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 11-15

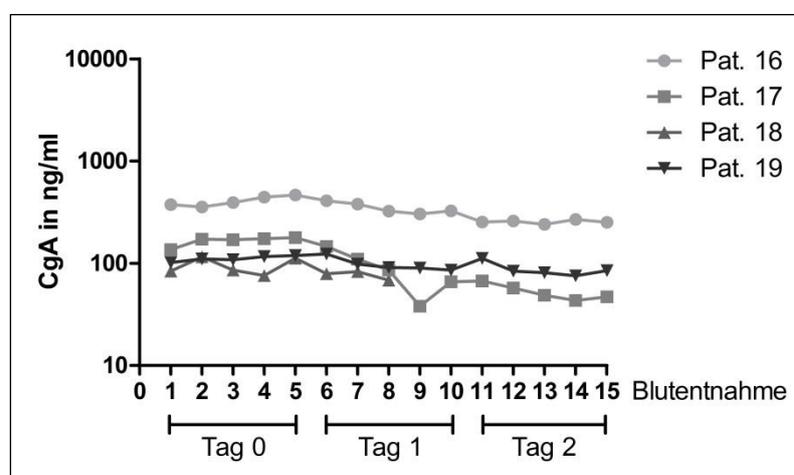


Abbildung 10: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 16-19

4.2.3.2 Langzeit-Verlaufsuntersuchungen von CgA

Es lagen insgesamt von 18 Patienten repetitive Daten nach SSA-Therapie-Einleitung vor. Fünf von 18 Patienten erlitten unter SSA-Therapie innerhalb der folgenden 2 Jahre eine Krankheitsprogression. In der Abbildung 11 sind diese CgA-Verläufe dargestellt. Die Abbildungen 12, 13 und 14 zeigen CgA-Verläufe von Patienten mit stabilen Erkrankungen. Alle Patienten mit stabiler Erkrankung wiesen 2 Monaten nach Beginn der SSA-Therapie niedrigere CgA-Werte als vor Behandlungsbeginn auf. Unter den Patienten mit progressivem Krankheitsverlauf befand sich lediglich ein Patient mit einem relevanten Abfall der CgA-Werte unter SSA-Therapie (Patient 09). Der Ausgangswert (Durchschnittswert der ersten 5 Messungen) dieses Patienten wurde mit 81,3 ng/ml normwertig gemessen.

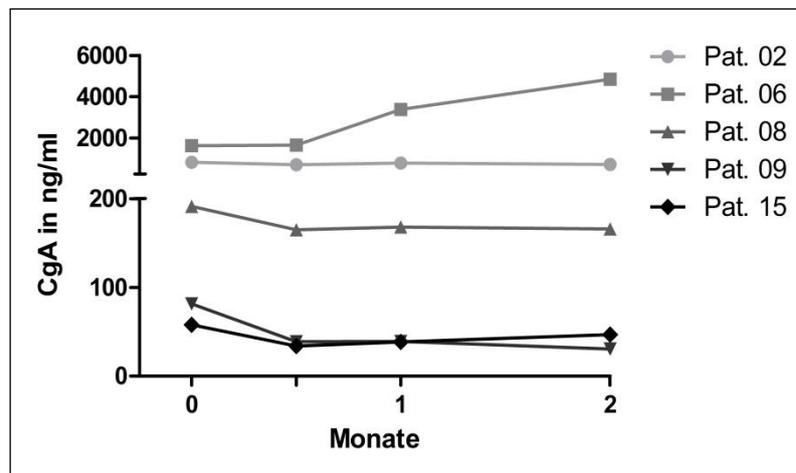


Abbildung 11: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 02, 06, 08, 09 und 15 mit fortschreitender Erkrankung innerhalb der folgenden 2 Jahre

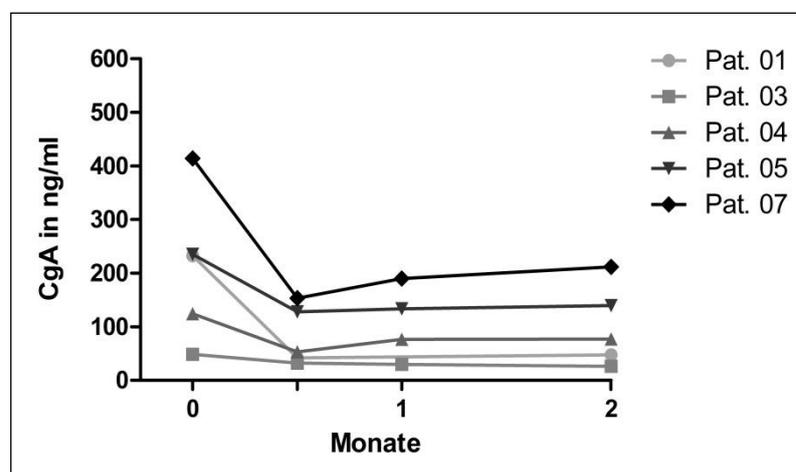


Abbildung 12: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 01, 03-05 und 07 mit stabiler Erkrankung

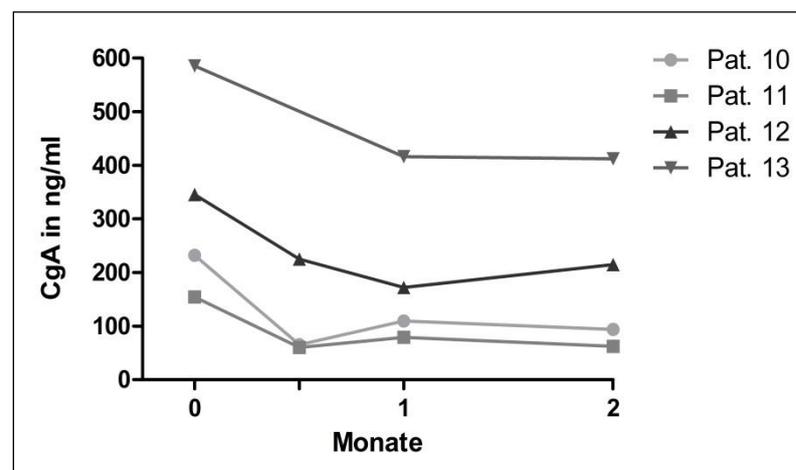


Abbildung 13: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 10-13 mit stabiler Erkrankung

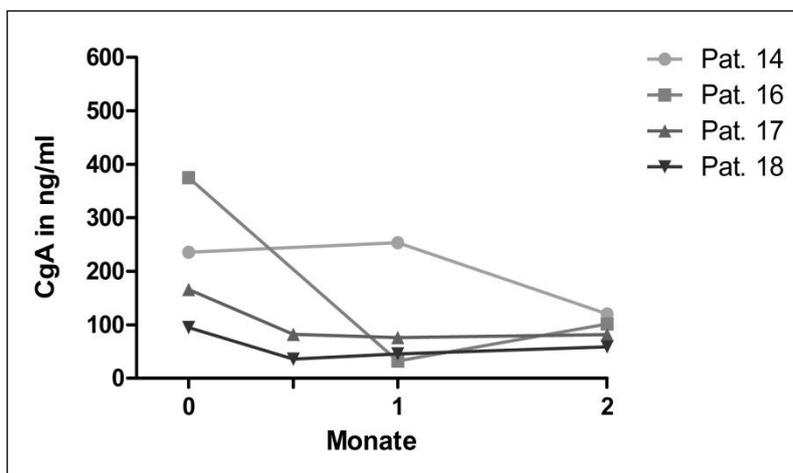


Abbildung 14: CgA-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 14, 16-18 mit stabiler Erkrankung

4.3 Placental Growth Factor

Folgende Analysen beziehen sich auf tumortragende Patienten mit NEN, wenn nicht explizit tumorfreie Patienten in den Analysen benannt sind.

4.3.1 Univariate Datenanalysen von PIGF

4.3.1.1 PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN im Vergleich zu tumorfreien und gesunden Probanden

Signifikant erhöhte PIGF-Spiegel wurden sowohl bei Patienten mit NEN als auch bei tumorfreien Patienten im Vergleich mit Gesunden ermittelt (Abbildung 15).

Zwischen Patienten mit NEN und Patienten mit bestehender Tumorfreiheit wurde kein statistischer Unterschied registriert ($p > 0,05$).

Die Receiver-Operating-Characteristic-Analyse von PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN und gesunder Probanden ergab eine AUC von 0,758. Zur Unterscheidung zwischen „Krankheit vorhanden“ oder „Krankheit nicht vorhanden“ scheint nach dieser ROC-Analyse der Grenzwert 15,35 pg/ml für PIGF geeignet zu sein. Eine graphische Darstellung zeigt Abbildung 16.

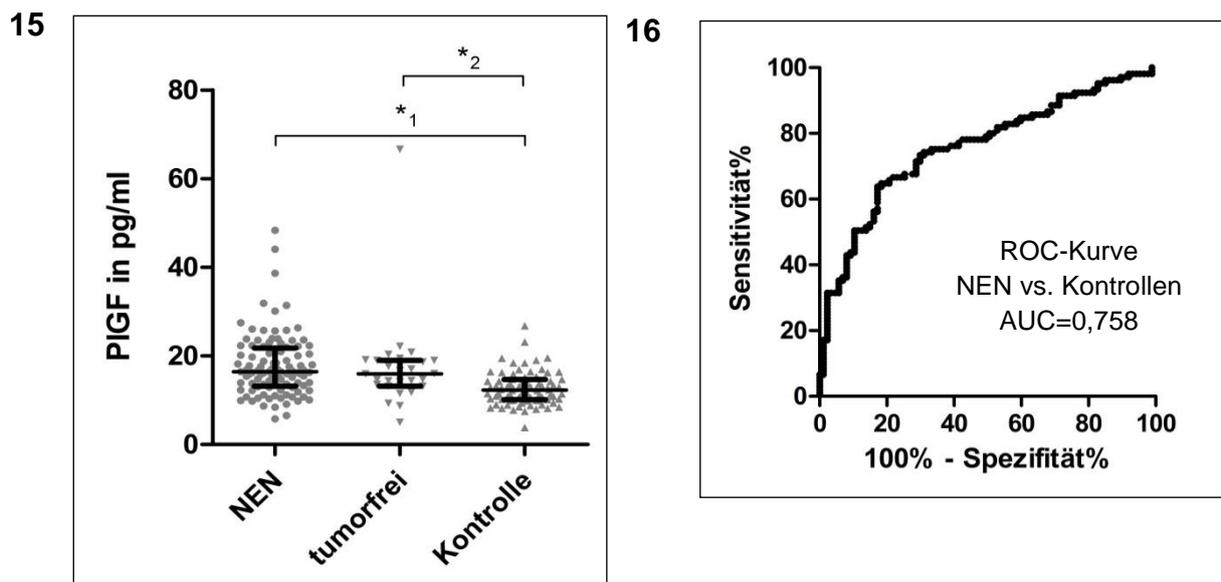


Abbildung 15: PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN und tumorfreien Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrolle

Dargestellt sind Scatter Dot-Plots mit Median von 16,42 pg/ml bei NEN-Patienten (n=105) versus 15,94 pg/ml bei tumorfreien Patienten (n=27) versus 12,30 pg/ml bei der gesunden Kontrolle (n=87) mit den dazugehörigen Interquartilbereichen, (*1 $p \leq 0,001$, NEN vs. Kontrolle; *2 $p \leq 0,01$, tumorfrei vs. Kontrolle), Kruskal-Wallis-Test.

Abbildung 16: ROC-Kurve von PIGF

Diese Analyse erlaubt Patienten mit NEN von gesunden Personen mit einer Sensitivität von 64% und einer Spezifität von 83% bei dem Grenzwert von 15,35 pg/ml zu unterscheiden (AUC=0,758, 95%-Konfidenzintervall: 0,690-0,826; $p < 0,0001$).

4.3.1.2 PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN nach der Primärtumorlokalisierung

Die Höhe der PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN, separiert nach der Primärtumorlokalisierung, unterschieden sich im Kruskal-Wallis-Test nicht ($p = 0,600$, Abbildung 17). Patienten mit pankreatische sowie jejunoileale Neoplasien wiesen einen ähnlich hohen PIGF-Median von 16,46 pg/ml bzw. von 16,89 pg/ml auf.

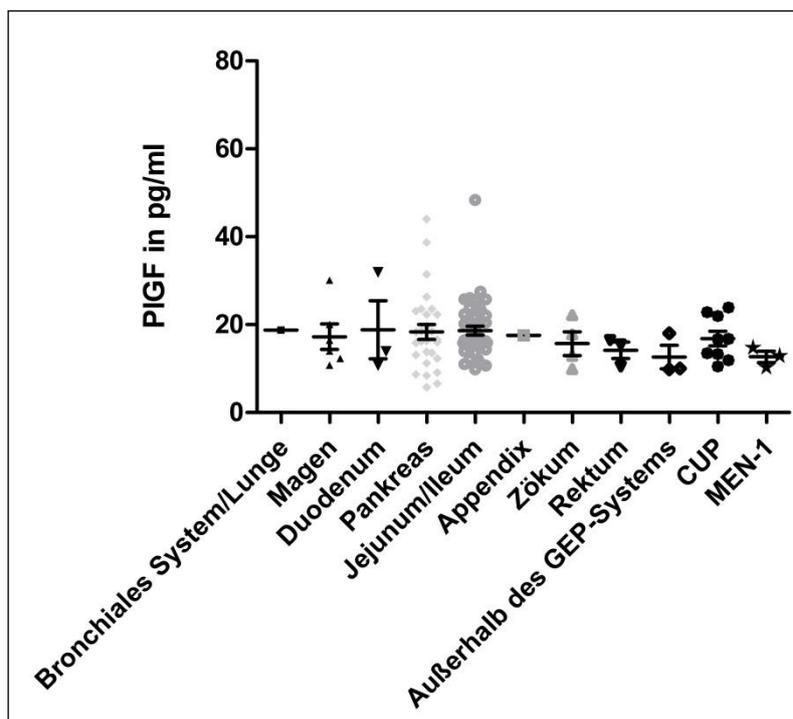


Abbildung 17: PIGF-Werte von Patienten mit NEN nach unterschiedlicher Primärtumorkomlokalisierung (Bronchiales System/Lunge (n=1); Magen (n=6); Duodenum (n=3); Pankreas (n=28); Jejunum/Ileum (n=44); Appendix (n=1); Zökum (n=4); Rektum (n=3); außerhalb des GEP-Systems (n=3); CUP (n=9); MEN-1 (n=3)) im Vergleich

Gezeigt sind Scatter Dot-Plots mit Median und Interquartilbereich, $p=0,600$; n.s., Kruskal-Wallis-Test.

4.3.1.3 PIGF-Spiegel bei Midguttumoren mit und ohne Karzinoidsyndrom

Ein Vergleich von Midgut-Patienten mit und ohne Karzinoidsyndrom zeigte in dieser Studie eine Assoziation von hohen PIGF-Werten mit dem Vorliegen eines Karzinoidsyndroms. Mittels Mann-Whitney-U-Test konnte ein Signifikanzwert von 0,047 errechnet werden (Abbildung 18).

In Abbildung 19 wurden zudem Patienten mit Karzinoidsyndrom mit und ohne karzinoidbedingter Herzerkrankung vergleichend gegenübergestellt. Unterschiede in der PIGF-Höhe ergaben sich hierbei nicht ($p=0,242$; n.s.).

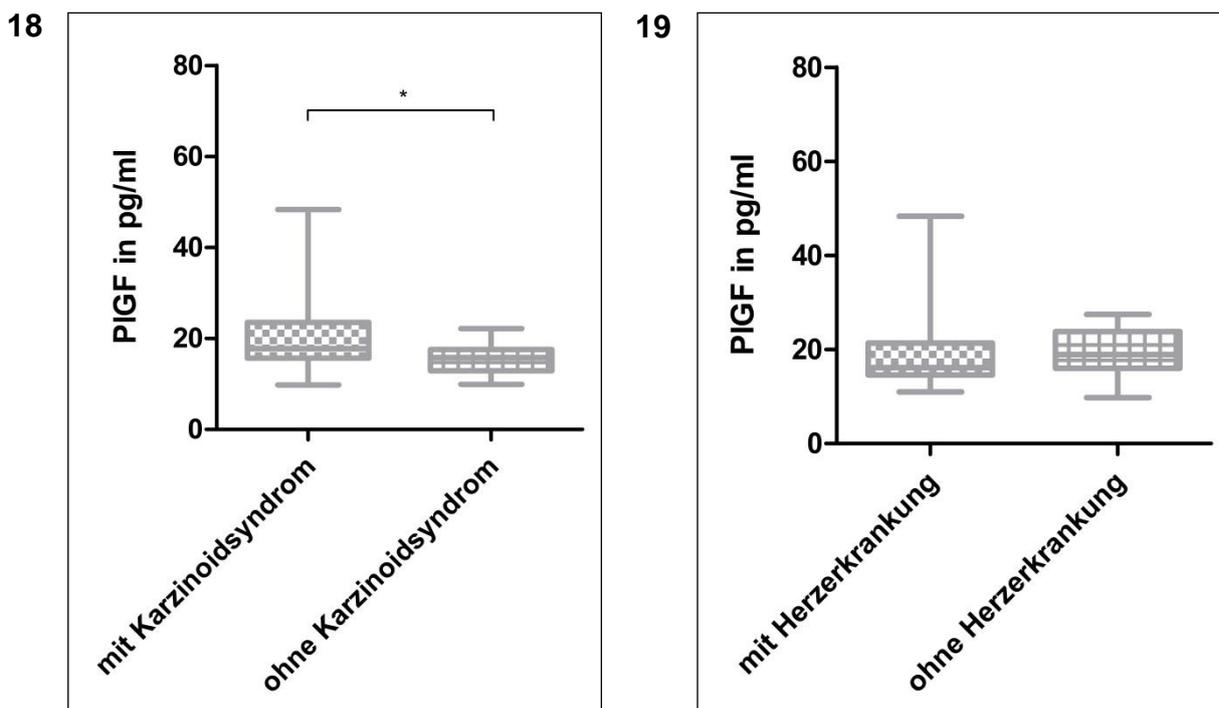


Abbildung 18: Erhöhte PIGF-Spiegel von Patienten mit Midguttumoren mit Karzinoidsyndrom (n=34) im Vergleich zu Midgut-Patienten ohne Karznoidsyndrom (n=15)

Gezeigt sind Box-Whisker-Plots mit Median und Interquartilbereich, * $p=0,047$; Mann-Whitney-Test.

Abbildung 19: PIGF-Spiegel von Patienten mit Midguttumoren mit Karzinoidsyndrom mit (n=13) und ohne Herzerkrankung (n=21)

Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit Median und Interquartilbereich, $p=0,242$; n.s.; Mann-Whitney-Test.

4.3.1.4 PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN mit unterschiedlichem Grading

NEN-Patienten mit differentem Grading zeigten keine Unterschiede bezüglich der PIGF-Spiegel (Kruskal-Wallis-Test; $p=0,378$; n.s.). So lag der Median bei G1-Neoplasien bei 16,31 pg/ml, bei G2-Neoplasien bei 17,30 pg/ml und bei G3-Neoplasien bei 19,73 pg/ml.

4.3.1.5 PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN im Tumorstadium I-III und IV

Eine Präsenz von Fernmetastasen war in der hiesigen Auswertung mit erhöhten PIGF-Spiegeln assoziiert. Hierfür konnte im Mann-Whitney-U-Test ein Signifikanzwert von 0,005 berechnet werden. Die Abbildung 20 zeigt diesen Vergleich.

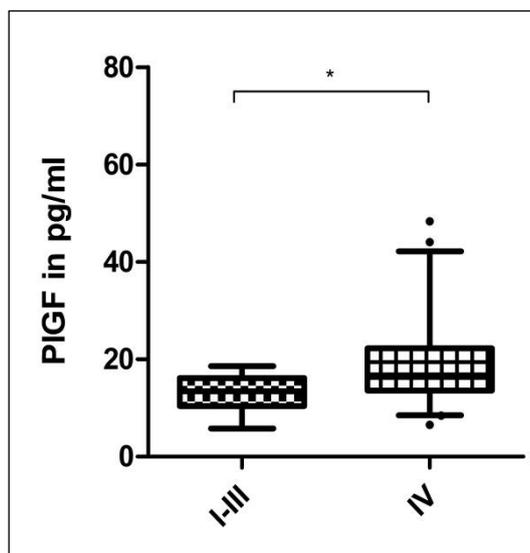


Abbildung 20: Assoziation erhöhter PIGF-Werte mit dem Tumorstadium IV (n=92) im Vergleich zum Tumorstadium I-III (n=13)

In Box-Whisker-Plots dargestellt; * $p=0,005$; Mann-Whitney Test.

Die Patienten mit Fernmetastasierung wiesen ein unterschiedliches Metastasierungsmuster auf. Der Vergleich hepatische Filiae versus extrahepatische Filiae versus hepatische und extrahepatische Filiae ergab im Kruskal-Wallis-Test keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Höhe der PIGF-Werte ($p=0,256$; n.s.). Tendenziell zeigten Patienten mit hepatischer und extrahepatischer Metastasierung höhere PIGF-Mediane als Patienten mit hepatischer oder extrahepatischer Tumormetastasierung allein.

4.3.1.6 PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN unter Berücksichtigung des Remissionsstatus

Patienten mit einem Progress als auch Patienten mit stabiler Erkrankungsphase wiesen zum Zeitpunkt der Blutabgabe zum großen Teil PIGF-Spiegel über 15,35 pg/ml auf. Die genaue Verteilung ist der Tabelle 16 zu entnehmen. Der Vergleich der PIGF-Werte in Abhängigkeit des Remissionsstatus SD und PD ergab keinen Unterschied im Mann-Whitney-U-Test ($p=0,342$; n.s.;).

Tabelle 16: Remissionsstatus (PD, SD) in Bezug auf PIGF-Wert < und > 15,35 pg/ml

	PD	SD
PIGF		
< 15,35 pg/ml	8	26
> 15,35 pg/ml	16	38

4.3.1.7 PIGF-Spiegel von Patienten mit NEN in Abhängigkeit von der Therapie

Über die Hälfte des Patientenguts erhielt zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine Therapie, wobei ca. 80% der Patienten mit SSA und etwa 20% der Patienten mit einer Chemotherapie behandelt wurden. Sechs weitere Patienten wurden im Rahmen von Studien therapiert, die aber im Folgenden keine Berücksichtigung fanden.

Patienten unter Chemotherapie hatten signifikant höhere PIGF-Spiegel im Kruskal-Wallis-Test im Vergleich mit Patienten ohne Therapie ($p \leq 0.001$) und mit Patienten, welche mittels SSA ($p \leq 0.05$) therapiert wurden. Unterschiede bezüglich „keine Therapie“ versus „SSA“ erhalten waren statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$; n.s.).

Diese Analyse ist in Abbildung 21 dargestellt.

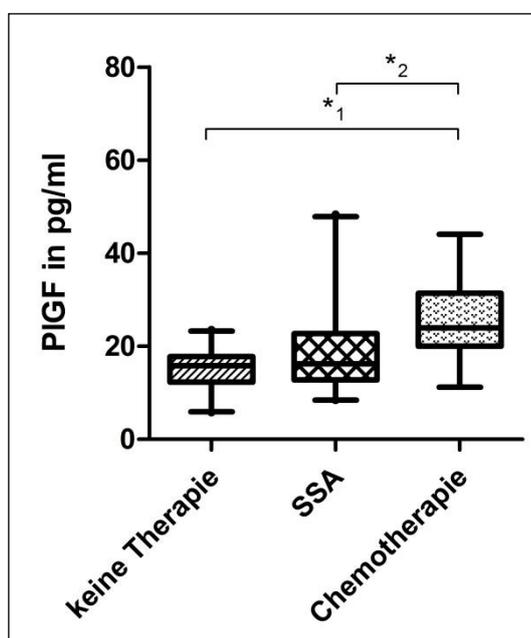


Abbildung 21: Erhöhte PIGF-Spiegel bei Chemotherapie-behandelten Patienten im Vergleich zu NEN-Patienten, die keine oder eine SSA-Therapie erhielten

Gezeigt sind Box-Whisker-Plots mit Median von 15,79 pg/ml von therapienaiven Patienten ($n=47$), von 16,22 pg/ml bei SSA-behandelten Patienten ($n=41$) und von 23,93 pg/ml bei Chemotherapie-behandelten Patienten ($n=11$) mit dem dazugehörigen Interquartilbereichen, (*1 $p \leq 0.001$, keine Therapie vs. Chemotherapie; *2 $p \leq 0.05$, SSA vs. Chemotherapie), Kruskal-Wallis-Test.

4.3.2 Verlaufsuntersuchungen von PIGF

4.3.2.1 Kurzzeit-Verlaufsuntersuchungen von PIGF

Bei den Verlaufsuntersuchungen von PIGF konnten bei einigen Patienten bereits ohne Einfluss einer SSA-Behandlung stark schwankende Spiegel im Tagesverlauf registriert werden, wie die Abbildungen 22-25 erkennen lassen. Bei dem Patienten 4 beispielsweise variierten die PIGF-Spiegel bereits ohne SSA-Medikation von 17,81 pg/ml bis 31,00 pg/ml. Nach SSA-Beginn verhielten sich die PIGF-Spiegel der insgesamt 19 Patienten different, nur fünf Patienten zeigten einen relevanten PIGF-Spiegelabfall (z.B. Patient 01; 06), dies sowohl bei stabilem als auch progredientem Tumorverlauf.

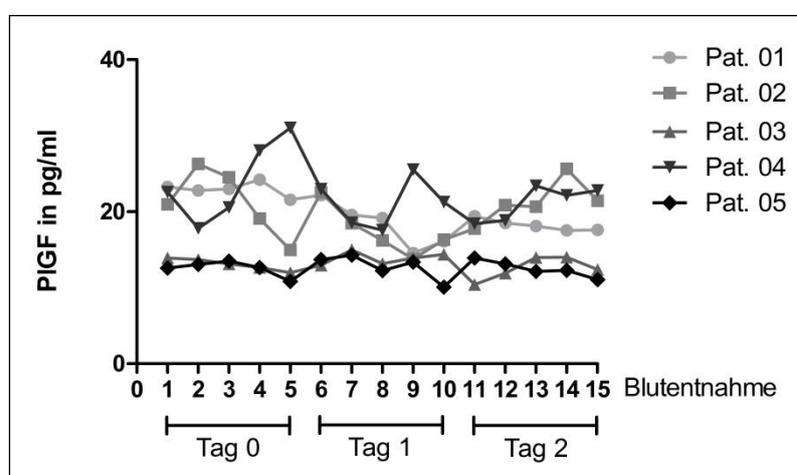


Abbildung 22: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 01-05

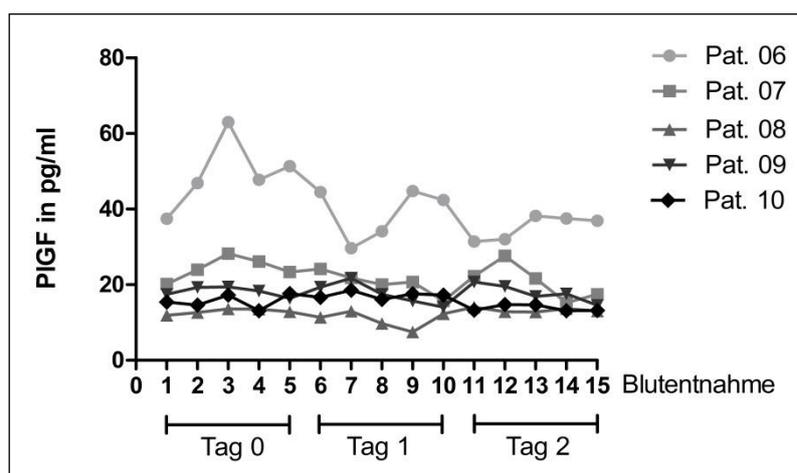


Abbildung 23: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 06-10

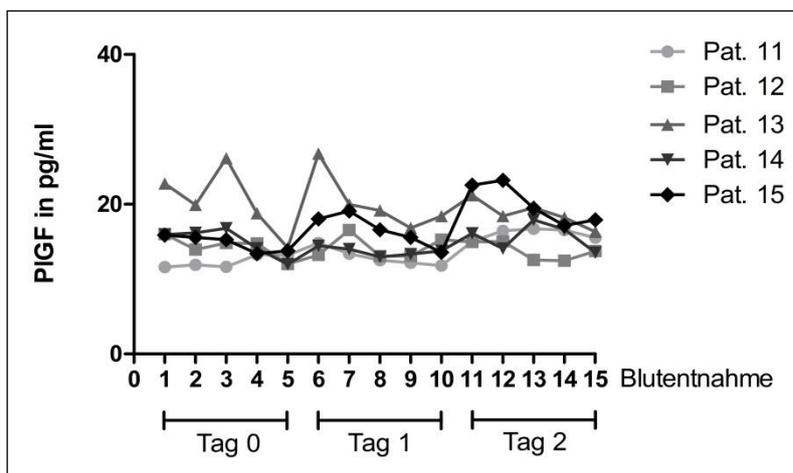


Abbildung 24: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 11-15

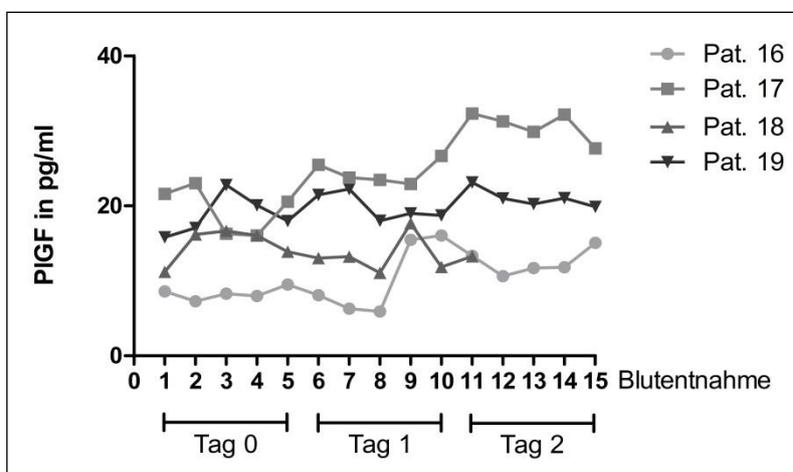


Abbildung 25: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 16-19

4.3.2.2 Langzeit-Verlaufsuntersuchungen von PIGF

Es erfolgten von insgesamt 18 Patienten repetitive Blutuntersuchungen von PIGF jeweils 14 Tage, 1 Monat und 2 Monate nach SSA-Therapiebeginn.

In der Abbildungen 26 sind die PIGF-Verläufe von fünf Patienten gezeigt, die unter SSA-Therapie innerhalb der folgenden 24 Monate eine Krankheitsprogression erlitten. In den Abbildungen 27-29 sind die PIGF-Verläufe von Patienten mit stabiler Tumorerkrankung dargestellt.

Bei der Mehrzahl der Patienten waren die PIGF-Spiegel unter SSA-Therapie nicht konkordant zum Tumorverlauf.

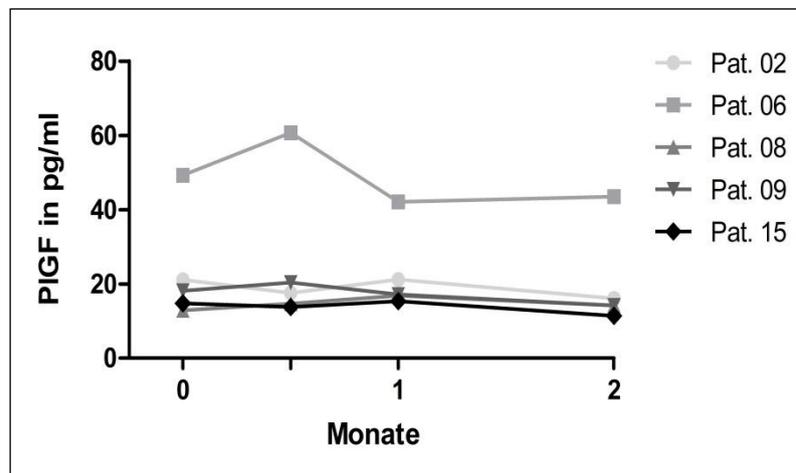


Abbildung 26: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 02, 06, 08, 09, 15 mit fortschreitender Erkrankung innerhalb der folgenden 2 Jahre

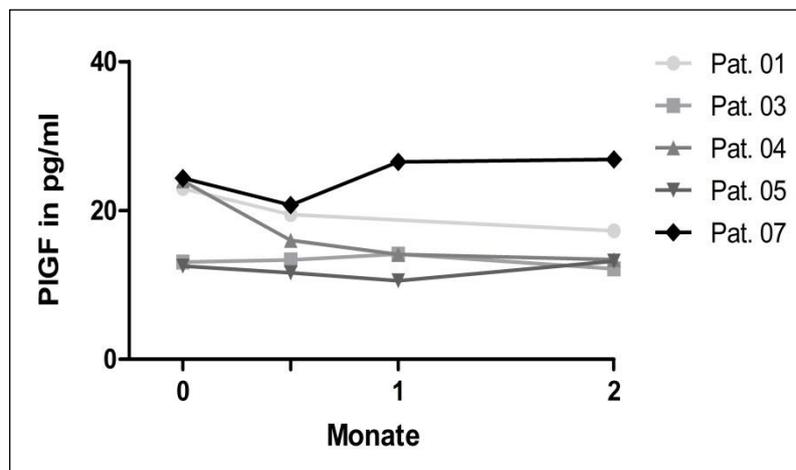


Abbildung 27: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 01, 03-05 und 07 mit stabiler Erkrankung

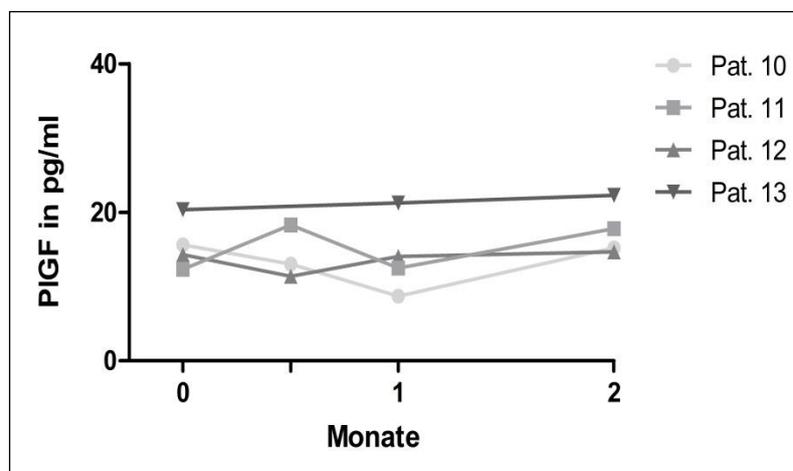


Abbildung 28: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 10-13 mit stabiler Erkrankung

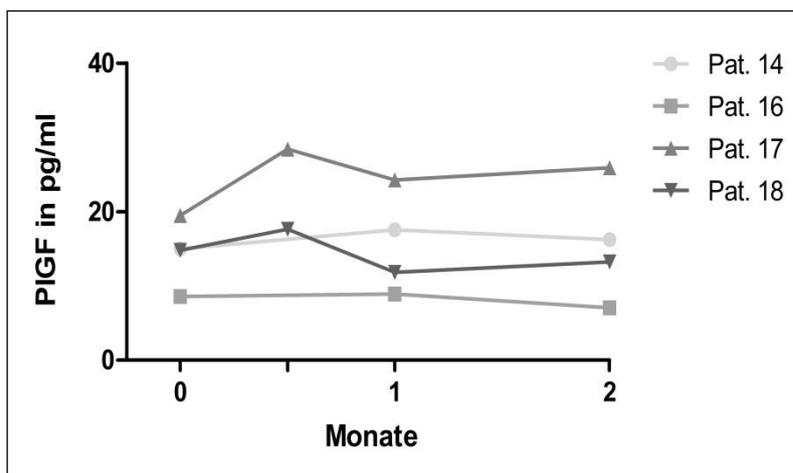


Abbildung 29: PIGF-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 14, 16-18 mit stabiler Erkrankung

4.4 soluble Fms-related Tyrosinkinase 1

Folgende Analysen beziehen sich auf tumortragende Patienten mit NEN, wenn nicht explizit tumorfreie Patienten in den Analysen benannt sind.

4.4.1 Univariate Datenanalysen von sFlt-1

4.4.1.1 sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN im Vergleich zu tumorfreien und gesunden Probanden

Im Vergleich zum gesunden Kollektiv waren in Patienten mit NEN signifikant erhöhte sFlt-1-Spiegel messbar ($p \leq 0,001$, Abbildung 30). Zur Differenzierung zwischen krank und gesund erfolgte eine ROC-Analyse von sFlt-1, wobei der Grenzwert 80,15 pg/m eine 83%ige Spezifität und 52%ige Sensitivität aufwies. Die Likelihood Ratio betrug hierbei 3,04. Diese Analyse ist in der Abbildung 31 gezeigt.

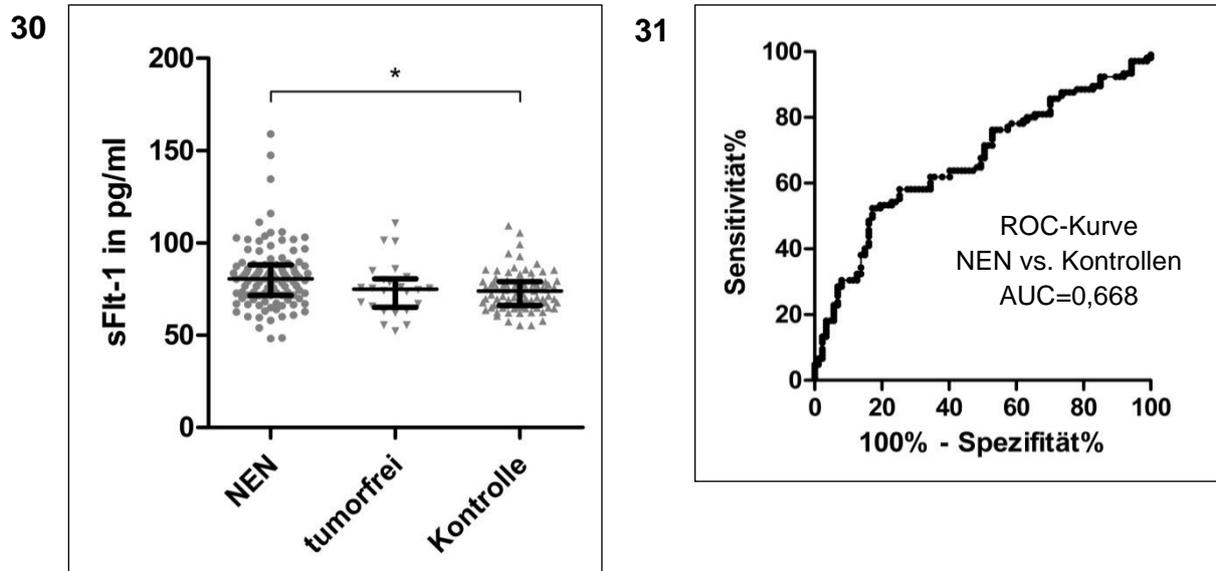


Abbildung 30: sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN und tumorfreien Patienten im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv

Abgebildet sind Scatter Dot-Plots mit Median von 80,5 pg/ml von NEN-Patienten (n=105) versus 75,0 pg/ml von tumorfreien Patienten (n=26) versus 73,9 pg/ml von gesunden Probanden (n=87) mit den dazugehörigen Interquartilbereichen, (* $p \leq 0,001$, NEN vs. Kontrolle; $p > 0,05$, NEN vs tumorfrei und tumorfrei vs. Kontrolle), Kruskal-Wallis-Test.

Abbildung 31: ROC-Kurve von sFlt-1

Diese Analyse ermöglicht zwischen Patienten mit NEN und gesunden Personen bei dem Grenzwert von 80,15 pg/ml mit einer Sensitivität von 52% und einer Spezifität von 83% zu differenzieren (AUC=0,668; 95%-Konfidenzintervall: 0.5916-0.7443; $p < 0.0001$).

4.4.1.2 sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN mit unterschiedlichem Grading

Bezüglich dem Grading G1, G2 und G3 ergab sich kein Unterschied hinsichtlich der sFlt-1-Spiegel bei Patienten mit NEN im Kruskal-Wallis Test ($p=0,938$, n.s.).

4.4.1.3 sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN im Tumorstadium I-III und IV

Patienten mit NEN im Stadium I-III unterschieden sich zudem nicht von Patienten mit fernmetastasierten Neoplasien (Stadium IV) in der Höhe der sFlt-1-Spiegel ($p=0,599$, n.s.; Mann-Whitney-U-Test).

4.4.1.4 sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN in Abhängigkeit von der Therapie

Ferner wurden Therapieregimes von NEN-Patienten hinsichtlich der sFlt-1-Spiegel analysiert, dargestellt in Abbildung 32. Patienten, die mittels SSA-Therapie behandelt wurden, hatten ähnlich niedrige sFlt-1-Spiegel wie Patienten ohne Behandlung. Dagegen

wiesen Patienten, die eine Chemotherapie erhielten, signifikant höhere sFlt-1-Spiegel auf als therapienaive Patienten ($p=0,046$; Kruskal-Wallis-Test).

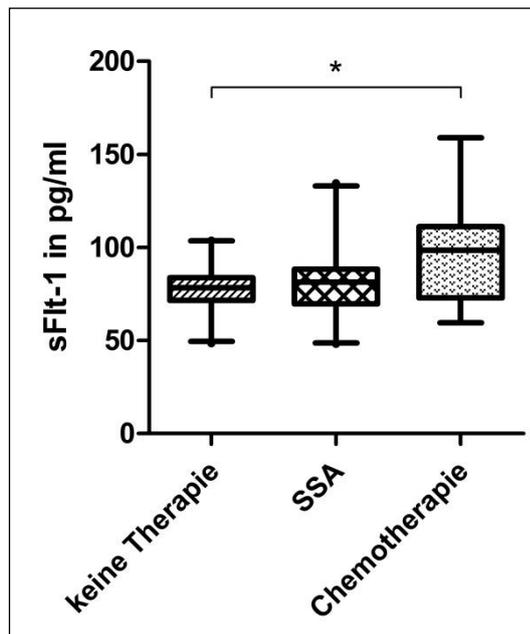


Abbildung 32: sFlt-1-Spiegel von NEN-Patienten mit NEN, sortiert nach der Art der erhaltenen Therapie

Dargestellt sind Box-Whisker-Plots mit Median von 78,30 pg/ml bei therapienaiven Patienten ($n=47$), von 81,40 pg/ml bei SSA-behandelten Patienten ($n=41$) und von 98,50 pg/ml bei Chemotherapie-behandelten Patienten ($n=11$) mit dem dazugehörigen Interquartilbereichen, (* $p=0,046$, keine Therapie vs. Chemotherapie; $p>0,05$, keine Therapie vs. SAA und SSA vs. Chemotherapie), Kruskal-Wallis-Test.

4.5 PIGF/sFlt-1

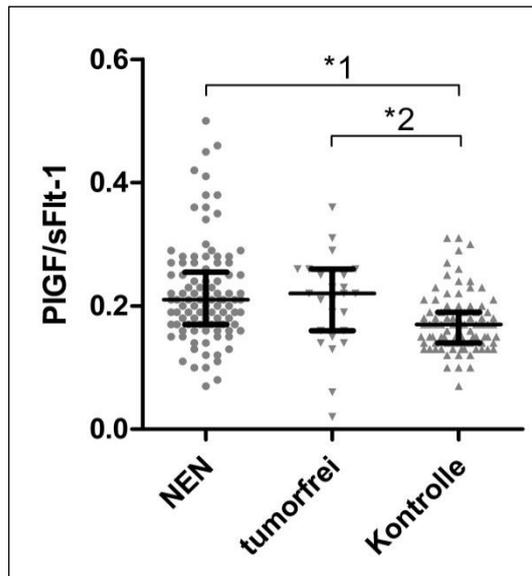
Zur Erfassung des biologisch aktiven PIGF wurde die Ratio aus PIGF und sFlt-1 berechnet.

4.5.1 Univariate Datenanalysen von PIGF/sFlt-1

4.5.1.1 PIGF/sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN im Vergleich zu tumorfreien und gesunden Probanden

Tumortragende als auch tumorfreie Patienten mit NEN hatten signifikant höhere PIGF/sFlt-1-Quotienten im Vergleich zum Kontrollkollektiv (Abbildung 33). Die ROC-Analyse der Ratio PIGF/sFlt-1 von Patienten mit NEN und gesunder Probanden ergab eine AUC von 0,704. Zur Unterscheidung zwischen „Krankheit vorhanden“ und „Krankheit nicht vorhanden“ wurde für die Ratio aus PIGF und sFlt-1 von 0,20 eine Spezifität von 80% und eine Sensitivität von 51% berechnet.

33



34

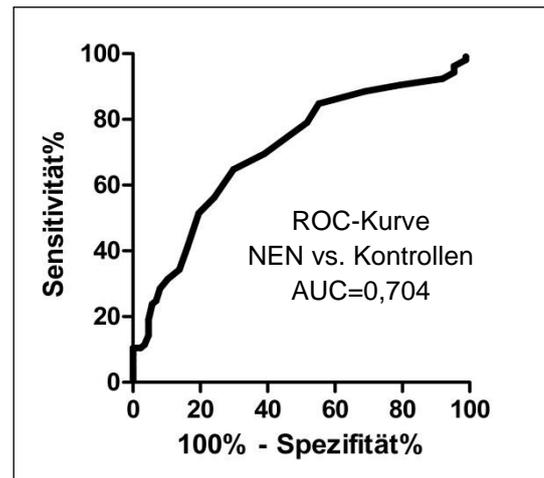


Abbildung 33: Ratio PIGF/sFlt-1 von Patienten mit NEN und tumorfreien Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrolle

Dargestellt sind Scatter Dot-Plots mit Median von 0,21 bei NEN-Patienten (n=105) versus 0,22 bei tumorfreien Patienten (n=27) versus 0,17 bei der gesunden Kontrolle (n=87) mit den dazugehörigen Interquartilbereichen, (*1 $p \leq 0,001$, NEN vs. Kontrolle; *2 $p \leq 0,01$, tumorfrei vs. Kontrolle), Kruskal-Wallis-Test.

Abbildung 34: ROC-Kurve von PIGF/sFlt-1

Diese Analyse ermöglicht zwischen Patienten mit NEN und gesunden Personen bei der Ratio von 0,20 mit einer Sensitivität von 51% und einer Spezifität von 80% zu differenzieren (AUC=0,704; 95%-Konfidenzintervall: 0.6306-0.7785; $p < 0.0001$).

4.5.1.2 PIGF/sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN mit unterschiedlichem Grading

NEN-Patienten mit differentem Grading zeigten keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der Ratio PIGF/sFlt-1 (Kruskal-Wallis-Test; $p=0,669$; n.s.).

4.5.1.3 PIGF/sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN im Tumorstadium I-III und IV

Patienten mit Tumorstadium IV wiesen eine höhere Ratio des PIGF/sFlt-1 Quotienten im Vergleich zu Patienten mit Tumorstadium I-III im Mann-Whitney-U-Test auf ($p=0,010$).

4.5.1.4 PIGF/sFlt-1-Spiegel von Patienten mit NEN in Abhängigkeit von der Therapie

Hinsichtlich der erhaltenen Therapie (keine, SSA, Chemotherapie) war bei Patienten mit NEN die Ratio PIGF/sFlt-1 nicht signifikant different in der Höhe im Kruskal-Wallis-Test ($p=0,146$; n.s.).

4.6 Serotonin

4.6.1 Verlaufsuntersuchungen von Serotonin

4.6.1.1 Kurzzeit-Verlaufsuntersuchungen von Serotonin

Von Serotonin erfolgten dynamische Messungen bei 15 Patienten mit NEN und nachgewiesenem Karzinoidsyndrom vor und nach Einleitung einer SSA-Therapie.

Die Analyse zeigte, dass die Serotoninspiegel im kurzen Verlauf 2 Tage nach Therapiebeginn bei zwölf von 15 der Patienten abnahmen. Bei einem Teil dieser Patienten fielen zudem stark schwankende Spiegel innerhalb eines Tages auf. Die Verläufe sind in den Abbildungen 35-37 dargestellt.

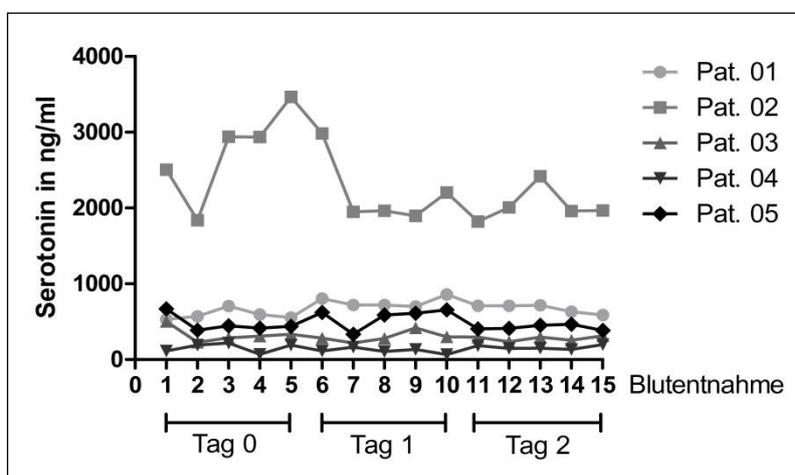


Abbildung 35: Serotonin-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 01-05

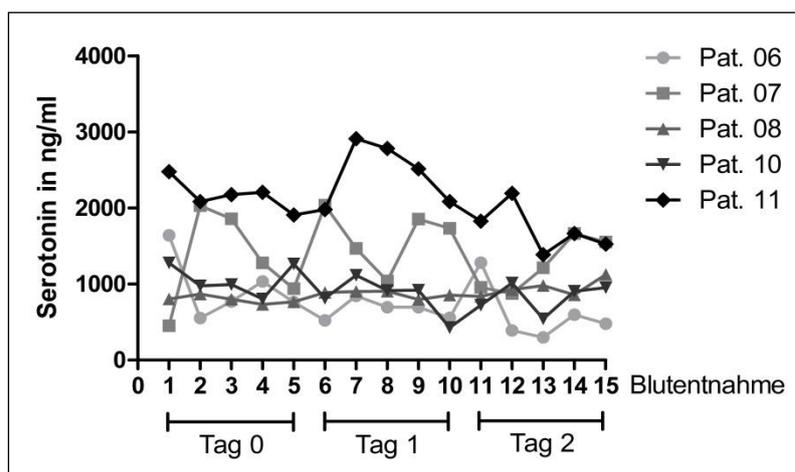


Abbildung 36: Serotonin-Wert-Verlaufsuntersuchungen Tag 0-2 von Patient 06-08, 10, 11

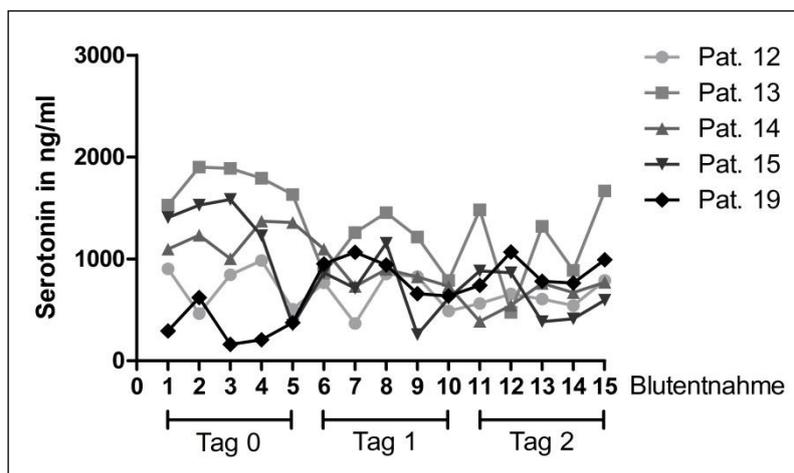


Abbildung 37: Serotonin-Wert-Verlaufsuntersuchung Tag 0-2 von Patient 12-15, 19

4.6.1.2 Langzeit-Verlaufsuntersuchungen von Serotonin

Ebenso waren von 15 Patienten repetitive Langzeitmessungen circa 14 Tage, 1 Monat und 2 Monate nach SSA-Therapiebeginn von Serotonin erfolgt.

Je nach Ausprägung des Karzinoïdsyndroms zeigten die Patienten interindividuell verschieden hohe Serotoninspiegel. Die Abbildung 38 stellt 4 Serotoninverläufe von Patienten mit fortschreitender Erkrankung im Verlauf dar. Die Abbildungen 39 und 40 zeigen Verläufe mit stabiler Erkrankung. Nach 2 Monaten zeigten 14 von 15 Patienten unabhängig vom Tumorverlauf eine Abnahme der Serotoninwerte nach Therapieinitiierung mit SSA. Lediglich bei dem Patienten 7 waren steigende Serotoninspiegel unter SSA-Therapie trotz stabilen Tumorverhalten messbar.

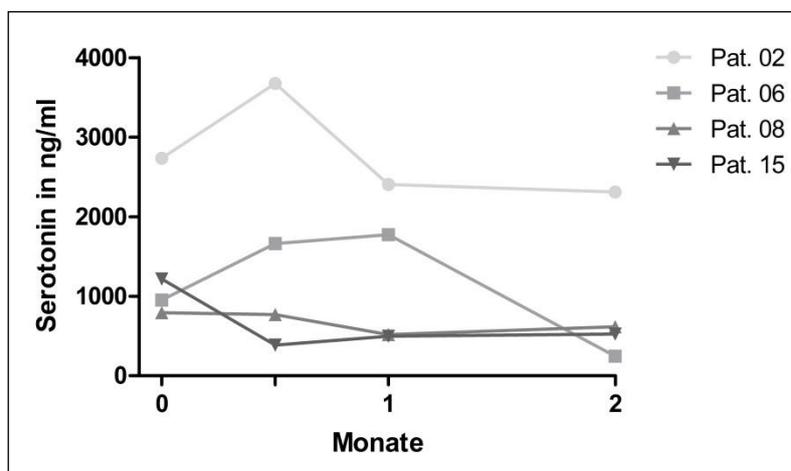


Abbildung 38: Serotonin-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 02, 06, 08 und 15 mit fortschreitender Erkrankung innerhalb der folgenden 2 Jahre

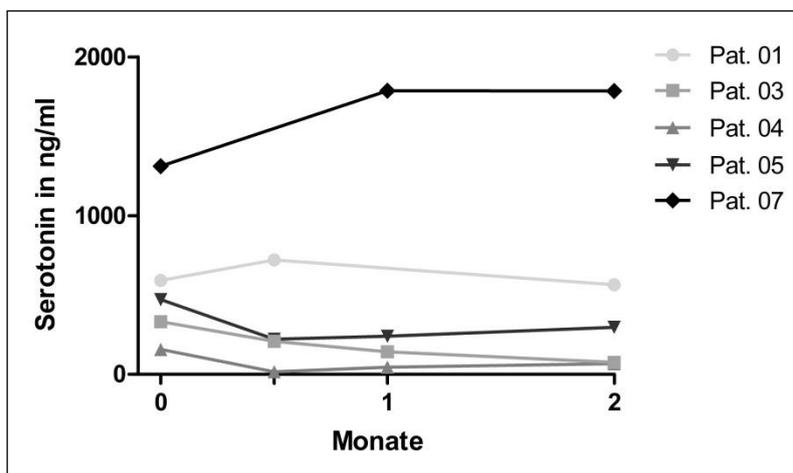


Abbildung 39: Serotonin-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 01, 03-05 und 07 mit stabiler Erkrankung

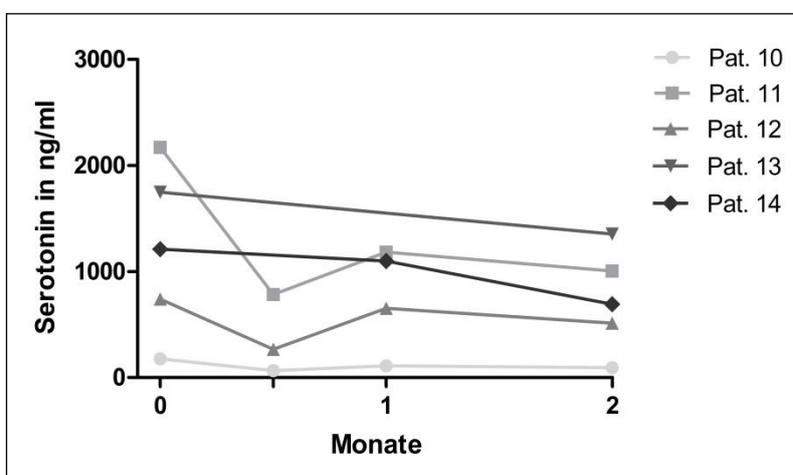


Abbildung 40: Serotonin-Wert-Verlaufsuntersuchungen von Patient 10-14 mit stabiler Erkrankung

4.7 Prognostische Faktoren für die Zeit bis zur Tumorprogression

Als prognostischer Parameter wurde die Zeit bis zur Tumorprogression gewählt. Dabei wurde eine Krankheitsprogression durch die RECIST-Kriterien 1.1 definiert. Es erfolgten anhand von Kaplan-Meier-Kurven univariate Analysen bezüglich der Zeit bis zur Tumorprogression. Dabei wurden potentielle Risikoparameter im Hinblick auf eine progressive Erkrankung evaluiert. Als Endpunkt wurde die Tumorprogression oder das Ausscheiden aus der Beobachtung gewählt. Der Stichprobenumfang der einzelnen Analysen variierte, da nicht für jeden Patienten das untersuchte Prognosekriterium vorlag. Signifikante Vorteile bezüglich der Zeit bis zur Tumorprogression zeigten niedrigere CgA- und PIGF-Spiegel als auch niedrige Ratio aus PIGF und sFlt1, welche im Weiteren noch genauer betrachtet werden. Das TNM-Stadium ($p=0,986$) mit Differenzierung

zwischen lokoregionaler gegenüber fortgeschrittener Tumorerkrankung erbrachte im Log-Rank-Test keinen Vorteil bezüglich der Zeit bis zur Tumorprogression. Gleichfalls zeigten höhere sFlt-1-Werte ($p=0,338$) kein erhöhtes Risiko für ein Fortschreiten der Erkrankung.

4.7.1 CgA-Spiegel bei Patienten mit NEN in Relation zur Zeit bis zur Tumorprogression

Patienten mit NEN wurden in zwei Gruppen eingeteilt, wobei Gruppe 1 aus 35 und Gruppe 2 aus 34 Patienten bestanden, die CgA-Werte kleiner, gleich beziehungsweise größer als der Median aufwiesen. Der Median konnte bei 165,4 ng/ml ermittelt werden. 17 Patienten der Patientengruppe 2 entwickelte im Verlauf eine Progression. Die Patientengruppe 1 mit niedrigeren CgA-Werten verzeichnete nur sechs Krankheitsprogressionen im Verlauf. Die Beobachtungszeit der Patienten betrug bis zu 26 Monaten. Mittels Log-Rank-Test konnte belegt werden, dass zirkulierende CgA-Spiegel oberhalb der 50. Perzentile mit einer schlechteren Prognose hinsichtlich einer Progression assoziiert waren (Abbildung 41).

Zu erwähnen ist, dass 27 Patienten in dieser Analyse aufgrund eines Tumorprogresses zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht berücksichtigt wurden.

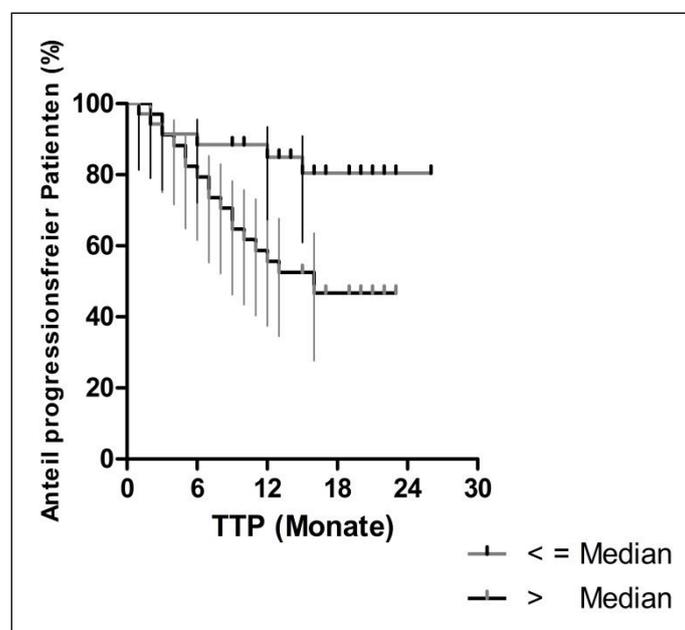


Abbildung 41: Bestätigung des prognostischen Potentials von CgA anhand einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezogen auf die Zeit bis zur Tumorprogression bei NEN

Dargestellt sind 2 Gruppen mit Zuordnung zu niedrigen ($\leq 50.$ Perzentile, entspricht $\leq 165,4$ ng/ml, $n=35$) oder zu hohen CgA-Spiegeln ($> 50.$ Perzentile, $n=34$); Hazard Ratio 3,071; 95%-Konfidenzintervall: 1.342-7.025; Log-Rank $p=0,008$.

4.7.2 PIGF-Spiegel bei Patienten mit NEN in Relation zur Zeit bis zur Tumorprogression

Ebenso wurde die Zeit bis zur Tumorprogression anhand der PIGF-Spiegel bei Patienten mit NEN untersucht. Die Gruppe 1 setzte sich aus 36 Patienten zusammen, die PIGF-Werte unterhalb, gleich des Medians von 16,16 pg/ml aufwiesen. Die Patientengruppe 2 bestand aus ebenfalls 35 Patienten, welche jedoch PIGF-Spiegel oberhalb des Medians hatten. In der Patientengruppe 2 zeigten 18 von 35 Patienten im Verlauf eine progressive Erkrankung. Nur sechs Patienten der Patientengruppe 1 erlitten im Verlauf eine Krankheitsprogression. Die Beobachtung der Patienten erfolgte ebenfalls bis zu 26 Monate. Mittels Log-Rank-Test konnte nachgewiesen werden, dass die gemessenen PIGF-Werte oberhalb der 50. Perzentile mit einem schlechteren Outcome hinsichtlich einer zeitnahen Progression assoziiert waren (Hazard Ratio: 3,960; 95%-Konfidenzintervall: 1.738-9.026; Log-Rank; $p=0,001$).

Im Folgenden wurden die Subgruppen pankreatische NEN und Midguttumore separat beurteilt.

4.7.2.1 PIGF-Spiegel bei pankreatischen NEN in Relation zur Zeit bis zur Tumorprogression

Ebenso wie die Gesamtkohorte wurden auch 17 Patienten mit pankreatischen NEN in der gleichen Art in 2 Gruppen (Gruppe 1 mit PIGF-Werten \leq Median, Gruppe 2 mit PIGF-Werten $>$ Median) eingeteilt. Der Median der PIGF-Spiegel befand sich bei diesem Kollektiv bei 16,61 pg/ml. Es zeigten drei Patienten in der Gruppe mit niedrigen PIGF-Spiegeln und vier Patienten in der Patientengruppe mit höheren PIGF-Werten eine Krankheitsprogression im Verlauf. Das mittlere Follow-up betrug zwölf Monate.

Elf Patienten mit Pankreastumoren fanden keine Berücksichtigung wegen einer Krankheitsprogression zum Zeitpunkt der PIGF-Abnahme.

Die Analyse der PIGF-Werte der eingeschlossenen Patienten mit Pankreastumoren erbrachte keine Informationen für die Einschätzung der Zeit bis zur Tumorprogression ($p= 0,717$; n.s.).

4.7.2.2 PIGF-Spiegel bei Midguttumoren in Relation zur Zeit bis zur Tumorprogression

Gleichfalls wie Patienten mit pankreatischen NEN wurden auch die Patienten mit Midguttumoren untersucht.

In dieser Auswertung zeigten 33 Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme keinen Progress und wurden daher in dieser Untersuchung berücksichtigt. Nach Zuordnung bestand Gruppe 1 aus 17 und Gruppe 2 aus 16 Patienten. Der Median befand sich bei 16,85 pg/ml. Bei 50 % der Patienten in der Gruppe 2 wurde im Verlauf ein Progress dokumentiert. Im Gegenteil dazu verzeichneten nur zwei Patienten in der Gruppe 1 im Verlauf eine Krankheitsprogression. Patienten mit Midguttumoren wurden bis zu 26 Monate beobachtet. Elf Patienten wurden aufgrund eines Progresses zum Zeitpunkt der Blutentnahme von dieser Analyse ausgeschlossen.

Insbesondere für Midguttumore konnte belegt werden, dass Patienten mit zirkulierenden PIGF-Werten oberhalb des Medians ein erhöhtes Risiko für eine zeitnahe Tumorprogression aufweisen (Abbildung 42).

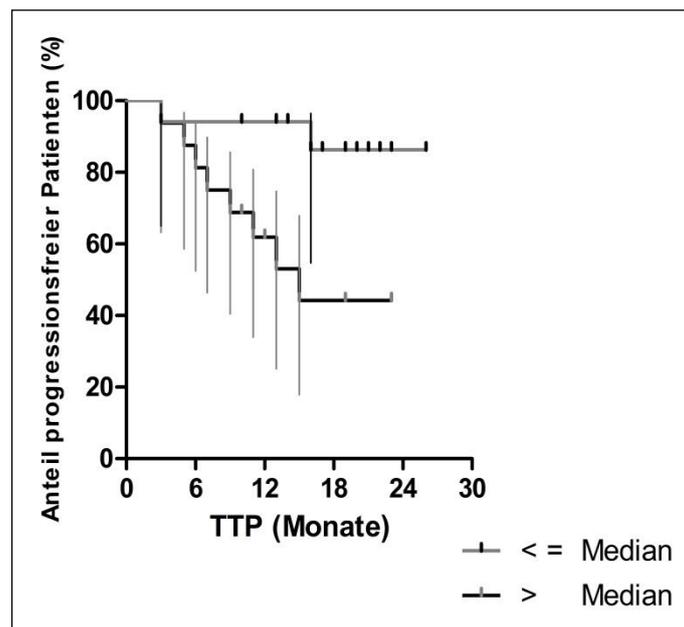


Abbildung 42: Bestätigung der prognostischen Relevanz von PIGF anhand einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezogen auf die Zeit bis zur Tumorprogression bei neuroendokrinen Midguttumoren

Dargestellt sind 2 Gruppen mit Zuordnung zu niedrigen ($\leq 50.$ Perzentile, entspricht $\leq 16,85$ pg/ml, n=17) oder hohen PIGF-Spiegeln ($> 50.$ Perzentile, n=16); Hazard Ratio 5,292; 95%-Konfidenzintervall: 1.470-19.05; Log-Rank p=0,011.

4.7.3 PIGF/sFlt-1-Spiegel bei Patienten mit NEN in Relation zur Zeit bis zur Tumorprogression

Als realistischer Wert für freies PIGF wurde die Ratio aus PIGF und sFlt-1 hinsichtlich des prognostischen Potentials untersucht.

In dieser TTP-Untersuchung bestanden die Gruppe 1 aus 36 Patienten und die Gruppe 2 aus 35 Patienten. Der Median wurde bei 0,19 ermittelt. Gruppe 1 bestand aus Patienten mit Werten unterhalb, gleich des Medians, Gruppe 2 aus Patienten mit Werten oberhalb des Medians. In der Gruppe 1 entwickelten sieben Patienten und in der Gruppe 2 17 Patienten einen Progress im Verlauf. Die Analyse ergab im Log-Rank-Test für höhere Ratio von PIGF/sFlt-1 ein erhöhtes Risiko für eine zeitnahe Tumorprogression (Abbildung 43).

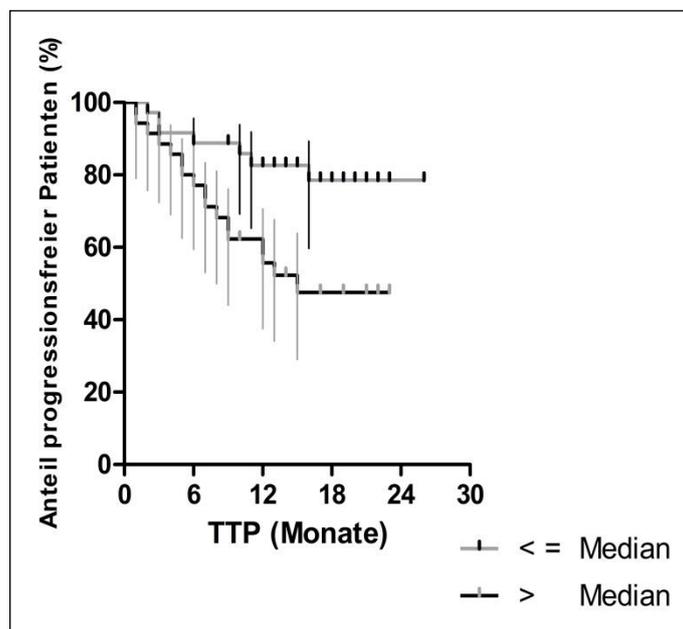


Abbildung 43: Bestätigung der prognostischen Relevanz von PIGF/sFlt-1 anhand einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve bezogen auf die Zeit bis zur Tumorprogression bei NEN

Dargestellt sind 2 Gruppen mit Zuordnung zu niedrigen ($\leq 50.$ Perzentile, entspricht $\leq 0,19$, $n=36$) oder hohen PIGF-Spiegeln ($> 50.$ Perzentile, $n=35$); Hazard Ratio: 0,3323; 95%-Konfidenzintervall: 0.1470-0.7511; Log-Rank; $p=0,008$.

4.7.4 Multivariate Datenanalyse

In der multivariaten Analyse wurden mit Hilfe des Cox-Regression-Modells mehrere unabhängige mögliche Risikoparameter für eine Krankheitsprogression unter Adjustierung des Geschlechts erfasst. Folgende Faktoren wurden in der multivariaten Analyse berücksichtigt: TNM-Stadium, Grading, SSA-Therapie, CgA- und PIGF-Spiegel ($> \text{Median}$ zu $\leq \text{Median}$), zu sehen in Tabelle 17.

Tabelle 17: Multivariate Analyse für die Zeit bis zur Tumorprogression bei NEN

Kovariate	Signifikanzwert	HR (95%-Konfidenzintervall)
Geschlecht (männlich/weiblich)	0,073	0,302 (0,082-1,116)
TNM-Stadium	0,347	0,455 (0,089-2,343)
Grading	0,768	0,858 (0,310-2,376)
SSA-Therapie*	0,084	0,312 (0,083-1,172)
CgA-Spiegel (> Median zu ≤ Median)	0,019	4,050 (1,255-13,070)
PIGF-Spiegel (> Median zu ≤ Median)	0,003	6,225 (1,829-21,188)

* 4 Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme ohne SSA-Therapie erhielten nach 2 bis 7 Monaten SSA zur Symptomkontrolle

Die multivariate Datenanalyse zeigt, dass CgA und vor allem PIGF unabhängig vom Geschlecht, dem Grading, dem TNM-Stadium und einer SSA-Therapie prognostische Parameter hinsichtlich der TTP bei NEN darstellen.

4.8 Korrelation zwischen CgA- und PIGF-Spiegel bei NEN-Erkrankten

Eine Korrelationsanalyse nach Spearman zeigte eine schwache signifikante Korrelation (Abbildung 44) zwischen den Biomarkern CgA und PIGF bei NEN-Erkrankten.

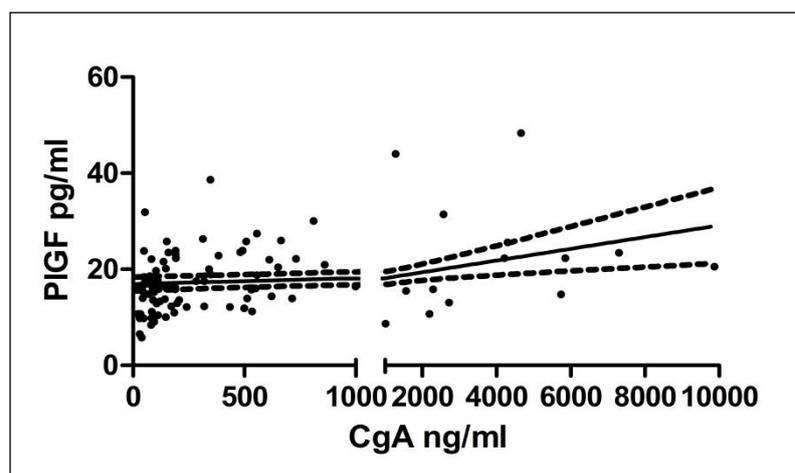


Abbildung 44: Korrelationsanalyse von PIGF und CgA bei Patienten mit NEN

Zu sehen ist eine schwache lineare, aber hochsignifikante Korrelation ($r=0,339$; $p=0,0005$).

4.9 Prädiktiver Wert von Tumormarkern nach SSA-Therapieeinleitung

4.9.1 Prädiktiver Wert von CgA

Es erfolgte eine Evaluierung des prädiktiven Wertes von CgA in der Patientenkohorte II. Hierbei wurde eine Reduzierung des Ausgangswertes von CgA 2 Tage bzw. 2 Monate nach Therapieeinleitung um mindestens 30% gefordert. Beim Vorhandensein mehrerer Messungen pro Tag wurde das arithmetische Mittel gewählt. Als Beobachtungszeitraum wurden 24 Monate festgelegt. Die genaue Verteilung der Patienten mit mindestens 30%igem Abfall oder fehlendem 30%igem Abfall in Bezug auf den Krankheitsverlauf ist der Tabelle 18 zu entnehmen.

Tabelle 18: Übersicht über die Verteilung der Patienten mit und ohne mindestens 30%igen Abfall von CgA 2 Tage bzw. 2 Monate nach SSA-Beginn mit Zuordnung zum weiteren Tumorverhalten

	SD		PD	
	> 30% Abfall	< 30% Abfall	> 30% Abfall	< 30% Abfall
2 Tag	10	3	1	4
2 Monate	12	1	1	4

Bei circa 60% bzw. 70% der Patienten konnte ein CgA-Abfall von mindestens 30% 2 Tage bzw. 2 Monaten nach Einleitung einer SSA-Therapie registriert werden, dies überwiegend konkordant zum Tumorverhalten.

Im Folgenden wurde der prädiktive Wert von CgA unter Zuhilfenahme einer Kaplan-Meier-Kurve bestätigt. Hierzu wurden die Patienten in 2 Gruppen einsortiert, Gruppe 1 mit Absinken der CgA-Spiegel und Gruppe 2 ohne Absinken der CgA-Spiegel um mindestens 30%. Patienten mit CgA-Abfall sowohl 2 Tage als auch 2 Monate nach Einleitung einer SSA-Therapie entwickelten signifikant weniger eine progressive Erkrankung in den folgenden 2 Jahren als Patienten ohne 30%igen CgA-Abfall ($p=0,016$; $p=0,001$), dargestellt in den Abbildungen 45 und 46.

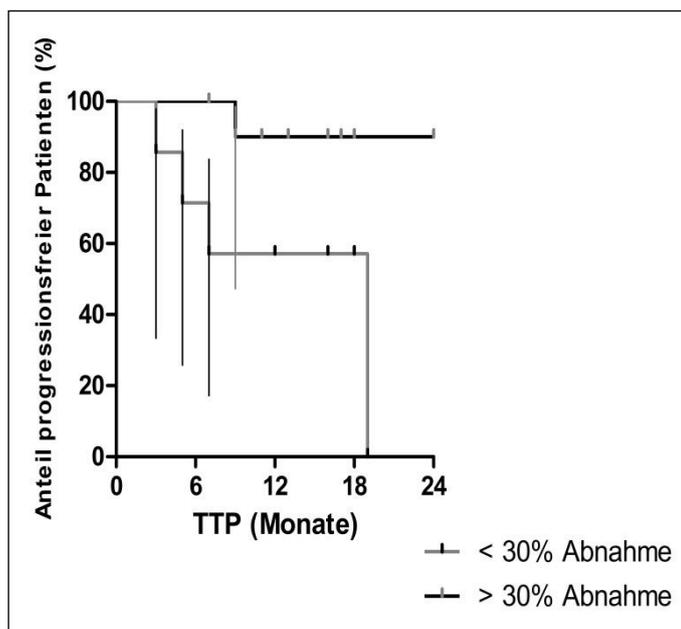


Abbildung 45: Bestätigung des prädiktiven Wertes von CgA hinsichtlich einer SSA-Therapie bei NEN zwei Tage nach Therapieinitiierung anhand einer Kaplan-Meier-Kurve
 Dargestellt sind 2 Gruppen mit Zuordnung zu einem und keinen Abfall von CgA um mindestens 30% nach SSA-Therapiebeginn; Hazard Ratio 0,09498; 95%-Konfidenzintervall: 0.01396-0.6461; Log-Rank $p=0,016$.

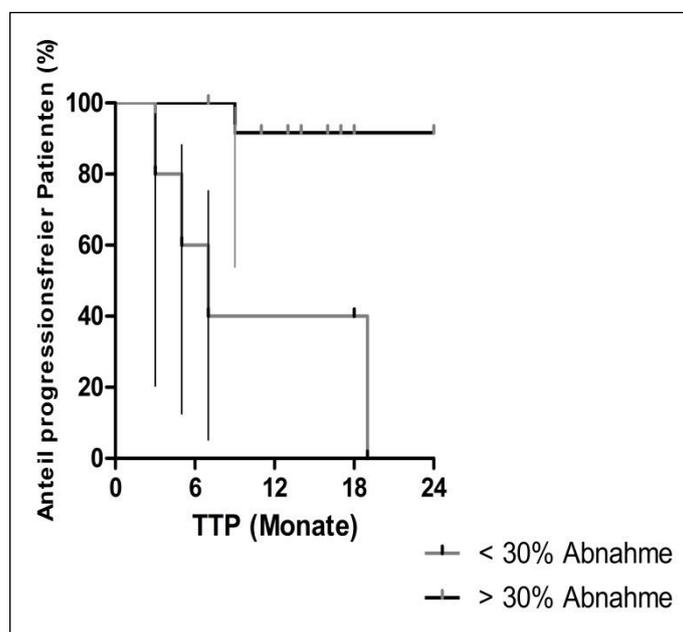


Abbildung 46: Bestätigung des prädiktiven Wertes von CgA hinsichtlich einer SSA-Therapie bei NEN zwei Monate nach Therapieinitiierung anhand einer Kaplan-Meier-Kurve
 Dargestellt sind 2 Gruppen mit Zuordnung zu einem und keinen Abfall von CgA um mindestens 30% nach SSA-Therapiebeginn; Hazard Ratio 0,02662; 95%-Konfidenzintervall: 0.003037-0.2333; Log-Rank $p=0,001$.

4.9.2 Prädiktiver Wert von PIGF

Für PIGF wurde als relevanter Abfall eine Reduktion des PIGF-Basalwertes um mindestens 10% nach SSA-Therapiebeginn definiert. Es zeigten insgesamt 5 bzw. 7 Patienten nach Therapieaufnahme eine Verminderung der PIGF-Spiegel nach 2 Tagen bzw. nach 2 Monaten. Die genaue Zuordnung wird in der Tabelle 19 wiedergegeben.

Tabelle 19: Übersicht über die Verteilung der Patienten mit und ohne mindestens 10%igen Abfall von PIGF 2 Tage und 2 Monate nach SSA-Beginn mit Zuordnung zum weiteren Tumorverhalten

	SD		PD	
	> 10% Abfall	< 10% Abfall	> 10% Abfall	< 10% Abfall
2 Tage	4	9	1	4
2 Monate	6	7	1	4

In Analogie zu CgA wurde mittels Kaplan-Meier-Analyse das prädiktive Potential von PIGF hinsichtlich des Therapieansprechens auf SSA 2 Tage als auch 2 Monate nach Therapiebeginn untersucht. Hierbei ergab sich kein prädiktiver Wert für PIGF ($p=0,710$ n.s.; $p=0,499$ n.s.).

5 Diskussion

Seltenheit und Variabilität des klinischen Verlaufs sind Kennzeichen neuroendokriner Tumorerkrankungen, aus denen sich unmittelbar ein dringender Bedarf für ein individualisiertes klinisches Management ableitet. Mit der Verfügbarkeit verschiedener Therapieoptionen stellt nun die Etablierung geeigneter Biomarker für das Monitoring und rational-basierte Therapieentscheidungen eine dringliche Aufgabe dar. Die vorgelegte Arbeit adressiert diese Aufgabenstellung anhand folgender Strategie:

Aufgrund der starken Vaskularisation von NEN könnten angiogene Wachstumsfaktoren eine Bedeutung für die Tumorausdehnung und Progression von NEN haben und möglicherweise als Tumormarker Verwendung finden. PIGF ist ein proangiogener Wachstumsfaktor, der mit einer vermehrten, aber typischerweise dysfunktionalen Vaskularisation von Tumoren verknüpft ist. sFlt-1 stellt einen antiangiogenen Wachstumsfaktor dar, der Liganden wie PIGF neutralisiert und dadurch deren Wirkung inhibiert. Im Unterschied zu PIGF stellt CgA einen Biomarker für NEN dar, der neurosekretorische Eigenschaften der NEN Tumorzellen widerspiegelt und für die Diagnosestellung bei NEN klinisch etabliert ist, wohingegen der prognostische und prädiktive Einsatz in der Tumornachsorge bei NEN umstritten bleibt (46, 51).

In der vorliegenden Analyse wurde der Nutzen von PIGF sowie sFlt-1 und deren Ratio als Tumormarker im Vergleich zu CgA untersucht. Im Weiteren wurde evaluiert ob diese Biomarker hinsichtlich der Prognose auch unter einer spezifischen Therapie mit SSA aussagekräftig sind. Nachstehend werden die Ergebnisse im Einzelnen kritisch beleuchtet und CgA gegenübergestellt.

5.1 Chromogranin A – Bestimmung durch unterschiedliche Assays

Erstmalig wurden in der vorliegenden Arbeit 3 klinisch verfügbare Testverfahren unter prospektiven Messbedingungen miteinander verglichen. Überraschend zeigten sich bei einem der Verfahren, dem DAKO ELISA-Assay, erhebliche Abweichungen bei Doppelbestimmungen, so dass weitere Analysen mit diesem Assay nicht sinnvoll erschienen. Die Ursache für die schlechte Reproduzierbarkeit der Messdaten ist unklar und weicht von publizierten Studien ab, die hohe Sensitivitäten für diesen Assay beschreiben. Potentielle Störgrößen, wie den Einsatz hämolytischer oder lipämischer Seren in den Messungen konnten wir weitgehend ausschließen – zudem sollten diese Parameter nach Herstellerangaben keine Rolle spielen.

Der CIS bio-RIACT-Assay sowie der neuwertige KRYPTOR-Assay zeigten unter Berücksichtigung der Stabilität von CgA in den Messungen die besten Ergebnisse bezüglich der Sensitivität und eine gute Übereinstimmung. Aufgrund der Vorteile des KRYPTOR-Assays, der automatisierten Handhabung ohne Verwendung radioaktiver Substanzen und der kurzen Messzeit, wurde diese Testmethode als eine robuste, sowie effiziente Testmethode evaluiert und konsekutiv als Routine-Assay etabliert.

Die erste Publikation zum Methodenvergleich unterschiedlicher Assays erfolgte 2003 von Stridsberg (59). Es handelte sich hierbei um eine sehr kleine Analyse an einem sehr heterogenen Patientengut. Darüber hinaus existieren weitere Analysen von zwei italienischen und einer argentinischen Arbeitsgruppe (Ferrari (113), Zatelli (114), Belli (115)). Von allen hier benannten Studien existieren unterschiedliche Grenzwerte. Die Grenzwerte wichen von den ermittelten Grenzwerten der ROC-Analysen der vorliegenden Daten ab.

Die Sensitivität des EURIA-Assays mit eigenem Normkollektiv untersuchten Stridsberg und Belli. Wir fanden eine geringere Sensitivität im Vergleich zu Stridsberg und Belli (69% versus 93%; 92,3%). Die berechneten Grenzwerte in der Studie von Stridsberg und Belli waren mit 4 nmol/l und 2,8 nmol/l niedriger als die berechneten Grenzwerte in der hiesigen Studie (6,6 nmol/).

Bezüglich des CIS bio-RIACT-Assays zeigte die hiesige Studie mit einer Sensitivität von 77% eine vergleichbare Sensitivität wie die von Ferrari (79%) und Zatelli (78%), jedoch ergab sich eine mäßige Abweichung der Sensitivität im Vergleich zu Stridsberg (67%). Der berechnete Grenzwert in der Studie von Zatelli (53 ng/ml) war deutlich niedriger im Vergleich zu den Grenzwerten von Ferrari (70 ng/ml), Stridsberg (99 ng/ml) als auch der hiesigen Studie (91,4 ng/ml). Eine Ursache ist mit hoher Wahrscheinlichkeit im unterschiedlichen Normkollektiv zu finden. Zatelli verwendete ein Kollektiv, bei dem mögliche Störfaktoren insbesondere eine Niereninsuffizienz mit Plasmakreatininwerten über 120 $\mu\text{M/l}$, ein Leberschaden, eine Protonenpumpentherapie, eine Parkinson-Erkrankung, eine Schwangerschaft und die Präsenz anderer Malignome explizit ausgeschlossen wurden, die zu falsch erhöhten CgA-Werten führen können. In unserem Kontrollkollektiv war eine Adjustierung aufgrund der Stichprobengröße und des retrospektiven Designs nicht möglich und fand daher keine Berücksichtigung.

Zudem wird auch die Heterogenität der Studienkollektive die unterschiedlichen Grenzwerte bedingen. Beispielsweise rekrutierte Stridsberg für die Berechnung des Grenz-

wertes auch Patienten mit fehlendem Zeichen einer aktiven Tumorerkrankung. Ferner unterschieden sich die Studienkollektive in der Verteilung der Primärtumoren und des Tumorstadiums.

Daneben gibt es zahlreiche Differentialdiagnosen eines erhöhten CgA-Wertes. Eine Herausforderung stellt daher die richtige Interpretation dar.

In der Literatur gibt es Hinweise, dass die Sensitivität auch von der Primärtumorlokalisation abhängt (118, 119), da die einzelnen Tumorentitäten je nach Art der neuroendokrinen Zelle verschieden gespaltene CgA aufgrund der gewebespezifischen Proteolyse sezernieren (46). Diese CgA-Fragmente können nur durch Assays mit passendem Antikörper erkannt werden (119). In der Mehrzahl der Studien zeigten sich für Neoplasien mit Ursprung im Midgut höhere Sensitivitäten für CgA im Vergleich zu NEN des Foregut (113, 118). Diese Differenz konnte in der hiesigen Studie nicht gefunden werden. In unserem Kollektiv scheinen die zirkulierenden Fragmente nicht sehr heterogen zu sein.

Bei Patienten mit höherer Tumorlast werden höhere Werte für CgA, beispielsweise beim Vorhandensein von Lebermetastasen, in der Literatur beschrieben (120, 121). Bei Midguttumoren mit Karzinoidsyndrom finden sich ebenso erhöhte CgA-Werte, was an einer vermehrten sympathoadrenalen Stimulation der Nebenniere liegen kann, welche sich auf die adrenale CgA-Sekretion und indirekt damit auf das Messergebnis und auf die Sensitivität auswirken kann. Erhöhte CgA-Werte wurden in der hiesigen Untersuchung insbesondere auch bei Patienten, die unter Chemotherapie standen, gefunden. Vermutlich, weil das Patientenkollektiv, bei dem die Chemotherapie initiiert wird ohnehin höhere Werte aufweisen und steigende CgA-Werte in die Therapieentscheidung einfließen.

Bemerkenswerter Weise wiesen in der hiesigen Studie tumorfreie Patienten ebenfalls erhöhte CgA-Werte im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv auf. Dies könnte im Zusammenhang mit einer Rezidivrate stehen. Eine Nachverfolgung dieses Patientengutes fand allerdings nicht statt.

Es ist ferner zu berücksichtigen, dass die unterschiedlichen Studien mit Serum und Plasma verschiedene Biomaterialien verwendet haben. Eine komparative Studie berichtet keinen Einfluss auf das Messergebnis im Vergleich von Plasma und Serum (122).

5.2 Chromogranin A – ein prognostischer und prädiktiver Biomarker bei NEN

Erwartungsgemäß hatten Patienten mit bekannten NEN signifikant erhöhte Spiegel von CgA im Vergleich mit gesunden Kontrollen. In der hier durchgeführten Kaplan-Meier-Analyse fanden wir bei Patienten mit erhöhten CgA-Werten eine signifikant kürzere Zeit bis zur Tumorprogression als bei Patienten mit niedrigen CgA-Werten.

Ferner zeigte eine Subkohorte von überwiegend NEN im Ileum und Jejunum bei circa 60% der Fälle innerhalb von 2 Tagen nach SSA-Therapieeinleitung einen CgA-Abfall. Dieser kurzzeitige Effekt ist am ehesten durch die SSA-bedingte verminderte Sekretion von CgA zu begründen. Eine Kontrolle der CgA-Werte 2 Monaten nach Beginn der SSA-Therapie ergab bei 70% der Patienten mit NEN ebenfalls geringere CgA-Werte im Vergleich zu den Ausgangswerten. Dieser Abfall korrelierte in 90% mit einem stabilen Tumorverhalten. Allerdings bestand die Indikation zur SSA-Therapie in diesem Kollektiv zu etwa Zweidrittel in der Sekretionskontrolle und weniger in der Tumorstadiumskontrolle, da sich die Mehrzahl der Patienten (n=11) zum Zeitpunkt der SSA-Therapieeinleitung per se in einer stabilen Erkrankungsphase befand. 4 von 5 Patienten mit fortschreitender Erkrankung hatten circa 2 Monate nach SSA-Therapiebeginn keinen relevanten CgA-Abfall. Dies galt insbesondere auch für 2 Patienten, die zum Zeitpunkt des SSA-Therapiebeginns als progredient galten. Fallende CgA unter SSA-Therapie waren in dieser Untersuchung prädiktiv für die Tumorstadiumskontrolle.

Eine vorausgegangene Studie belegte bereits eine Änderung der CgA-Spiegel in Abhängigkeit des Tumorstadiums hinsichtlich einer Progression (123).

Ein erhöhter CgA-Wert kann jedoch nicht nur ein Ausdruck von Sekretion und Progression, sondern auch ein Abbild des Tumorstadiums sein. Im klinischen Alltag kann diese Abgrenzung vor allem beim metastasierten funktionellen NEN schwierig sein.

Zu berücksichtigen bleibt jedoch auch, dass in der hiesigen Studie Schwankungen der CgA-Spiegel im Tagesverlauf nachgewiesen werden konnten. In der Literatur wurden Änderungen des Mittelwerts von einem zum anderen Tag zwischen 21-29% beschrieben bei Gesunden und bei NEN-Erkrankten (44, 124). Ursächlich hierfür wird teils die Beeinflussung durch die Nahrungsaufnahme sein (124). Ob es einen Zusammenhang zwischen den schwankenden CgA-Werten und Episoden klinischer Hypersekretionssymptomatik gibt, kann die aktuelle Studie nicht beantworten, da solche Episoden nicht standardisiert dokumentiert wurden.

5.3 PIGF und PIGF/sFlt-1 – angiogene Biomarker mit prognostischem Potential

Bei der Erhaltung des Gleichgewichts zwischen pro- und antiangiogenen Prozessen der Gefäßneubildung in unmittelbarer Umgebung des Tumors wird sFlt-1 durch Bindung und anschließender Inaktivierung von proangiogenen Faktoren wie PIGF eine bedeutende Rolle zu gesprochen.

PIGF nimmt eine Schlüsselposition bei der pathologischen Neubildung von Gefäßen ein (80), und stellt dadurch einen maßgebenden Faktor beim Tumorwachstum und der Metastasierung dar (125, 126). Patienten mit NEN wiesen ähnlich wie Patienten mit anderen soliden Neoplasien erhöhte PIGF-Spiegel im Vergleich zu gesunden Probanden auf (127-129). Erhöhte PIGF-Spiegel fanden sich jedoch auch bei tumorfreien Patienten im Vergleich mit Gesunden. Möglicherweise spricht dies für ein Wiederauftreten der NEN-Erkrankung ebenso wie bei CgA. Zudem fanden sich erhöhte PIGF-Spiegel als auch höhere PIGF/sFlt-1-Quotienten beim Tumorstadium IV, dies könnte mit der Tumorlast im Zusammenhang stehen.

Ebenso wiesen Patienten mit NEN erhöhte sFlt-1-Werte im Vergleich zu den Kontrollen auf. Anders als für CgA und PIGF wurde keine Erhöhung von sFlt-1 bei tumorfreien Patienten nachgewiesen. Zudem konnte für sFlt-1 allein kein prognostisches Potential im Hinblick auf eine Tumorprogression belegt werden. Die klinische Bedeutung von sFlt-1 allein bleibt daher weiterhin unklar.

Demgegenüber waren in den univariaten Datenanalysen sowohl PIGF als auch für die Ratio aus PIGF und sFlt-1 prognostische Parameter im Hinblick auf die Zeit bis zur Tumorprogression. Darüber hinaus wurde der Mehrwert von PIGF im Vergleich zu CgA in einer multivariaten Analyse in der Gesamtkohorte bestätigt. In der Radiant-3 Studie wurde PIGF als prognostischer, aber nicht prädiktiver Biomarker bei pankreatischen NEN beschrieben (101). In Subgruppenanalysen unserer Kohorte wurde jedoch das prognostische Potential von PIGF nur bei Midguttumoren und nicht bei pankreatischen NEN belegt. Vor dem Hintergrund des nachgewiesenen prognostischen Potentials von PIGF für pNET in der Radiant-3 Studie (n=410, Endpunkt: Gesamtüberleben) als auch in einer retrospektiven Untersuchung unserer Arbeitsgruppe (n=87, Endpunkt: tumorbezogenes Überleben) ist die wahrscheinlichste Ursache hierfür in der geringen Fallzahl unseres Kollektivs (n=17) zu finden. Andere, weniger wahrscheinliche Ursachen wie die Heterogenität von neuroendokrinen Pankreastumoren als Solche konnten wir nicht aus-

schließen (3, 6, 130, 131). Ob die Heterogenität auch eine unterschiedlich hohe Produktion und Freisetzung von PIGF bewirkt, ist nicht bekannt. Die PIGF-Spiegel unseres Kollektivs mit NEN im Pankreas waren deutlich niedriger messbar als die des Kollektivs der Radiant-3-Studie (Range 6,55-38,67 pg/ml versus 9,8-3985,5 pg/ml) (101). Andererseits könnte eine höhere Tumorlast, höhere proliferative Aktivität, vorangegangene Therapien die höher gemessenen PIGF-Spiegel bedingen. Im Weiteren erbrachten weder das TNM-Stadium, noch das Grading in der Multivariaten Analyse eine prognostische Information. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die numerisch deutlich geringere Fallzahl der Patienten im Stadium I bis III als auch mit Gradeinteilung G3 zu erklären. Ferner waren erhöhte PIGF-Werte mit einem Karzinoidsyndrom assoziiert. Möglicherweise wurde diese Korrelation durch einen Zusammenhang mit der Tumorlast vorge-täuscht, da ein Karzinoidsyndrom oft erst im metastasierten Stadium zum Tragen kommt, wenn die Leber Mediatoren wie das Serotonin nicht mehr ausreichend abbauen kann. In der analysierten Kohorte mit Karzinoidsyndrom zeigten Patienten mit einer karzinoidbedingten Kardiomyopathie im Vergleich zu Patienten ohne Karzinoidherzerkrankung keinen Unterschied in Bezug auf die Höhe von PIGF. In unserer Studie wurden jedoch Patienten mit Pro-BNP 2-Werte über 500 pg/ml aus der Gesamtkohorte aufgrund einer beschriebenen positiven Korrelation zwischen PIGF und Pro-BNP 2 bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie ausgeschlossen (132).

Weiterhin wurde der Einfluss von Therapien auf PIGF unter anderem von Zytostatika untersucht. Eine Indikation zur Zytostatika-Therapie ist aktuell das Vorliegen einer niedrigdifferenzierten NEN, oder ein Progress bei G1- oder G2-Tumoren des Pankreas mit Proliferationsraten über 10% (1, 10). Patienten, welche mittels Zytostatika behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu therapienaiven Patienten in Einpunktmessungen signifikant erhöhte PIGF-Werte. Möglicherweise ist diese Assoziation durch einen Zusammenhang mit einer fortgeschrittenen Erkrankungsphase (Tumorlast oder Progression) nur vorgetäuscht. Andernfalls wäre auch die vermehrte Freisetzung durch einen Zellzerfall nach zytotoxischer Therapie oder durch die zytostatische Therapie selbst zu diskutieren. Patienten unter Chemotherapie wiesen allerdings keine Erhöhung der Ratio PIGF/sFlt-1 auf. Ob dies eine weitere Bedeutung hat, muss in weiteren Analysen noch geklärt werden. Ferner wurde kein Unterschied in der Höhe der PIGF-Spiegel zwischen therapienaiven und mittels SSA- behandelten Patienten registriert.

Der prädiktive Stellenwert von PIGF konnte nur für SSA untersucht werden, da nur für

dieses Kollektiv dynamische Messungen vorlagen. Jedoch wurde kein prädiktiver Wert in Hinblick auf ein Ansprechen einer SSA-Therapie nachgewiesen. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass das untersuchte Kollektiv mehrheitlich aus Patienten mit stabilen Krankheitsverläufen zur Zeit der Untersuchung bestand. Allenfalls wäre eine Ausweitung der Untersuchung auf ein Kollektiv mit progredienten Verläufen zu empfehlen.

In den letzten Jahren ist die Einführung eines RNA-basierten Multianalytassays (NETest[®]) mit großem Interesse verfolgt worden, der bezüglich seiner prognostischen und prädiktiven Wertigkeit mit CgA besser erscheint (133, 134). Eine Anwendung des NETest[®] in der klinischen Routine ist aber angesichts der logistisch aufwendigen Präanalytik mit der Notwendigkeit einer sofortigen Kühlung und raschen Weiterverarbeitung der Proben schwer umsetzbar (135). Zudem ist der NETest[®] zwar bereits kommerzialisiert, aber noch nicht frei verfügbar, wohingegen die Bestimmung von PIGF bereits als Routinediagnostik für Präeklampsie etabliert ist. Vergleichende prospektive Bestimmungen von PIGF und NETest[®] sowie von CgA als Benchmark wären wünschenswert, um diese Alternativen besser gegeneinander abwägen zu können.

5.4 Serotoninverhalten unter einer SSA-Therapie

Als Sekretionsprodukt neuroendokriner Zellen stellt der Neurotransmitter Serotonin einen bereits etablierten Biomarker für funktionelle NEN dar. (3, 53). In unseren Analysen konnten stark schwankende Spiegel im Tagesverlauf registriert werden. Nach Therapieinitiierung mit SSA zeigte sich mehrheitlich bei den Patienten eine Abnahme der Serotoninspiegel, konkordant zu einer vorangegangenen Studie (136). Für die Routinediagnostik ist der Marker jedoch weniger bedeutsam, da Serotonin keinen relevanten Mehrwert im Vergleich zu CgA erbringt und die Messungen von CgA zudem leichter erfolgen können.

Zusammenfassend wurde für die Routinediagnostik der CgA-KRYPTOR-Assay im Vergleich verschiedener Assays als robuste, und zugleich effiziente Testmethode evaluiert und etabliert. Der prognostische Stellenwert von CgA konnte die Ergebnisse vorangegangener Studien bestätigen (137, 138). Darüber hinaus ergibt sich ein prädiktives Potential von CgA für den Einsatz von SSA.

PIGF stellt einen neuartigen Biomarker dar, der das Potential besitzt als prognostischer

Tumormarker bei NEN vor allem im fortgeschrittenen Krankheitsstadium genutzt zu werden. Ein Vorteil ist vermutlich die geringere Störanfälligkeit aufgrund von Komorbiditäten und Komedikationen. Bezugnehmend auf die multivariate Datenanalyse wurde für PIGF ein prognostischer Mehrwert im Vergleich zu CgA nachgewiesen. Daher erscheint PIGF ein vielversprechender Biomarker zu sein, vor allem bei NEN, bei denen CgA nicht aussagekräftig genug ist. Weitere Studien und prospektive Validierungen sind jedoch erforderlich.

Literaturverzeichnis

1. Rinke A, Wiedenmann B, Auernhammer C, Bartenstein P, Bartsch DK, Begum N, Faiss S, Fottner C, Gebauer B, Goretzki P, Jansen PL, Pöppel G, Scherübl H, Weber MM, Gress TM, M P. S2k-Leitlinie Neuroendokrine Tumore. Zeitschrift für Gastroenterologie. 2018;56(06):583-681.
2. Ozimek A, Götze O, Samaras P, Schiesser M. Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumoren. Schweizer Zeitschrift für Onkologie. 2011;2:32-8.
3. Kaltsas GA, Besser GM, Grossman AB. The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors. *Endocr Rev.* 2004;25(3):458-511. Epub 2004/06/08. doi: 10.1210/er.2003-0014. PubMed PMID: 15180952.
4. Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer.* 2003;97(4):934-59. Epub 2003/02/06. doi: 10.1002/cncr.11105. PubMed PMID: 12569593.
5. Dralle H. [Neuroendocrine tumors. More variety than uniformity]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin.* 2011;82(7):565-6. Epub 2011/05/24. doi: 10.1007/s00104-010-2064-6. PubMed PMID: 21603959.
6. Zikusoka MN, Kidd M, Eick G, Latich I, Modlin IM. The molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer.* 2005;104(11):2292-309. Epub 2005/11/01. doi: 10.1002/cncr.21451. PubMed PMID: 16258976.
7. Oberstein PE, Saif MW. Update on prognostic and predictive biomarkers for pancreatic neuroendocrine tumors. *JOP : Journal of the pancreas.* 2012;13(4):368-71. Epub 2012/07/17. doi: 10.6092/1590-8577/965. PubMed PMID: 22797391.
8. Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, Shih T, Yao JC. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA oncology.* 2017;3(10):1335-42. Epub 2017/04/28. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0589. PubMed PMID: 28448665; PubMed Central PMCID: PMC5824320.
9. Ploekinger U, Kloepfel G, Wiedenmann B, Lohmann R. The German NET-registry: an audit on the diagnosis and therapy of neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology.* 2009;90(4):349-63. Epub 2009/09/25. doi: 10.1159/000242109. PubMed PMID: 19776553.

10. Maasberg S, Pape UF, Fottner C, Goretzki PE, Anlauf M, Hörsch D, Cremer B, Schulte DM, Quietzsch D, Scheerer F, Pöpperl G, Poeppel TD, Begum N, Grohé C, A R. [Neuroendocrine Neoplasia within the German NET Registry]. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*. 2018;56(10):1237-46. Epub 2018/10/12. doi: 10.1055/a-0661-6099. PubMed PMID: 30304748.
11. van der Lely AJ, de Herder WW. Carcinoid syndrome: diagnosis and medical management. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2005;49(5):850-60. Epub 2006/01/31. doi: /S0004-27302005000500028. PubMed PMID: 16444370.
12. Barakat MT, Meeran K, Bloom SR. Neuroendocrine tumours. *Endocrine-related cancer*. 2004;11(1):1-18. Epub 2004/03/19. PubMed PMID: 15027882.
13. Rubin de Celis Ferrari AC, Glasberg J, Riechelmann RP. Carcinoid syndrome: update on the pathophysiology and treatment. *Clinics*. 2018;73(suppl 1):e490s. Epub 2018/08/23. doi: 10.6061/clinics/2018/e490s. PubMed PMID: 30133565; PubMed Central PMCID: PMC6096975.
14. Vinik AI, Woltering EA, Warner RR, Caplin M, O'Dorisio TM, Wiseman GA, Coppola D, Go VL. NANETS consensus guidelines for the diagnosis of neuroendocrine tumor. *Pancreas*. 2010;39(6):713-34. Epub 2010/07/29. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181ebaffd. PubMed PMID: 20664471.
15. Plockinger U, Wiedenmann B. [Neuroendocrine tumours of the gastrointestinal tract]. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*. 2004;42(6):517-27. Epub 2004/06/11. doi: 10.1055/s-2004-812697. PubMed PMID: 15190448.
16. Modlin IM, Sandor A. An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors. *Cancer*. 1997;79(4):813-29. Epub 1997/02/15. PubMed PMID: 9024720.
17. Pape UF, Berndt U, Muller-Nordhorn J, Bohmig M, Roll S, Koch M, Willich SN, Wiedenmann B. Prognostic factors of long-term outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocrine-related cancer*. 2008;15(4):1083-97. Epub 2008/07/08. doi: 10.1677/ERC-08-0017. PubMed PMID: 18603570.
18. Toumpanakis CG, Caplin ME. Molecular genetics of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *The American journal of gastroenterology*. 2008;103(3):729-32. Epub 2008/03/18. doi: 10.1111/j.1572-0241.2007.01777.x. PubMed PMID: 18341492.

19. Scherubl H, Schaaf L, Raue F, Faiss S, Zeitz M. [Hereditary neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors and multiple endocrine neoplasia type 1. I. Diagnosis]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2004;129(12):630-3. Epub 2004/03/11. doi: 10.1055/s-2004-820573. PubMed PMID: 15011133.
20. Koncz E, Schmid KW. [Multiple endocrine neoplasia type I]. *Der Pathologe.* 2010;31(6):445-8. Epub 2010/10/21. doi: 10.1007/s00292-010-1356-4. PubMed PMID: 20960195.
21. Zhuang Z, Vortmeyer AO, Pack S, Huang S, Pham TA, Wang C, Park WS, Agarwal SK, Debelenko LV, Kester M, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Yu F, Heppner C, Crabtree JS, Skarulis MC, Venzon DJ, Emmert-Buck MR, Spiegel AM, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Burns AL, Marx SJ, Lubensky IA, et al. Somatic mutations of the MEN1 tumor suppressor gene in sporadic gastrinomas and insulinomas. *Cancer research.* 1997;57(21):4682-6. Epub 1997/11/14. PubMed PMID: 9354421.
22. Goebel SU, Heppner C, Burns AL, Marx SJ, Spiegel AM, Zhuang Z, Lubensky IA, Gibril F, Jensen RT, Serrano J. Genotype/phenotype correlation of multiple endocrine neoplasia type 1 gene mutations in sporadic gastrinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2000;85(1):116-23. Epub 2000/01/14. PubMed PMID: 10634374.
23. Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, Schulick RD, Tang LH, Wolfgang CL, Choti MA, Velculescu VE, Diaz LA, Jr., Vogelstein B, Kinzler KW, Hruban RH, Papadopoulos N. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science.* 2011;331(6021):1199-203. Epub 2011/01/22. doi: 10.1126/science.1200609. PubMed PMID: 21252315; PubMed Central PMCID: PMC3144496.
24. Scarpa A, Chang DK, Nones K, Corbo V, Patch AM, Bailey P, Lawlor RT, Johns AL, Miller DK, Mafficini A, Rusev B, Scardoni M, Antonello D, Barbi S, Sikora KO, Cingarlini S, Vicentini C, McKay S, Quinn MC, Bruxner TJ, Christ AN, Harliwong I, Idrisoglu S, McLean S, Nourse C, Nourbakhsh E, Wilson PJ, Anderson MJ, Fink JL, Newell F, Waddell N, Holmes O, Kazakoff SH, Leonard C, Wood S, Xu Q, Nagaraj SH, Amato E, Dalai I, Bersani S, Cataldo I, Dei Tos AP, Capelli P, Davi MV, Landoni L, Malpaga A, Miotto M, Whitehall VL, Leggett BA, Harris JL, Harris J, Jones MD, Humphris J, Chantrill LA, Chin V, Nagrial AM, Pajic M,

- Scarlett CJ, Pinho A, Rooman I, Toon C, Wu J, Pinese M, Cowley M, Barbour A, Mawson A, Humphrey ES, Colvin EK, Chou A, Lovell JA, Jamieson NB, Duthie F, Gingras MC, Fisher WE, Dagg RA, Lau LM, Lee M, Pickett HA, Reddel RR, Samra JS, Kench JG, Merrett ND, Epari K, Nguyen NQ, Zeps N, Falconi M, Simbolo M, Butturini G, Van Buren G, Partelli S, Fassan M, Australian Pancreatic Cancer Genome I, Khanna KK, Gill AJ, Wheeler DA, Gibbs RA, Musgrove EA, Bassi C, Tortora G, Pederzoli P, Pearson JV, Waddell N, Biankin AV, Grimmond SM. Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature*. 2017;543(7643):65-71. Epub 2017/02/16. doi: 10.1038/nature21063. PubMed PMID: 28199314.
25. Veschi S, Lattanzio R, Aceto GM, Curia MC, Magnasco S, Angelucci D, Cama A, Piantelli M, Battista P. Alterations of MEN1 and E-cadherin/beta-catenin complex in sporadic pulmonary carcinoids. *International journal of oncology*. 2012;41(4):1221-8. Epub 2012/07/25. doi: 10.3892/ijo.2012.1563. PubMed PMID: 22825745; PubMed Central PMCID: PMC3583815.
26. Mafficini A, Scarpa A. Genomic landscape of pancreatic neuroendocrine tumours: the International Cancer Genome Consortium. *The Journal of endocrinology*. 2018;236(3):R161-R7. Epub 2018/01/13. doi: 10.1530/JOE-17-0560. PubMed PMID: 29321190; PubMed Central PMCID: PMC5811627.
27. Mafficini A, Scarpa A. Genetics and Epigenetics of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Endocrine reviews*. 2019;40(2):506-36. Epub 2019/01/19. doi: 10.1210/er.2018-00160. PubMed PMID: 30657883; PubMed Central PMCID: PMC6534496.
28. Sadanandam A, Wullschleger S, Lyssiotis CA, Grotzinger C, Barbi S, Bersani S, Korner J, Wafy I, Mafficini A, Lawlor RT, Simbolo M, Asara JM, Blaker H, Cantley LC, Wiedenmann B, Scarpa A, Hanahan D. A Cross-Species Analysis in Pancreatic Neuroendocrine Tumors Reveals Molecular Subtypes with Distinctive Clinical, Metastatic, Developmental, and Metabolic Characteristics. *Cancer discovery*. 2015;5(12):1296-313. Epub 2015/10/09. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0068. PubMed PMID: 26446169; PubMed Central PMCID: PMC4946251.
29. Wang H, Bender A, Wang P, Karakose E, Inabnet WB, Libutti SK, Arnold A, Lambertini L, Stang M, Chen H, Kasai Y, Mahajan M, Kinoshita Y, Fernandez-Ranvier G, Becker TC, Takane KK, Walker LA, Saul S, Chen R, Scott DK, Ferrer

- J, Antipin Y, Donovan M, Uzilov AV, Reva B, Schadt EE, Losic B, Argmann C, Stewart AF. Insights into beta cell regeneration for diabetes via integration of molecular landscapes in human insulinomas. *Nature communications*. 2017;8(1):767. Epub 2017/10/05. doi: 10.1038/s41467-017-00992-9. PubMed PMID: 28974674; PubMed Central PMCID: PMC5626682.
30. Alvarez MJ, Subramaniam PS, Tang LH, Grunn A, Aburi M, Rieckhof G, Komissarova EV, Hagan EA, Bodei L, Clemons PA, Dela Cruz FS, Dhall D, Diolaiti D, Fraker DA, Ghavami A, Kaemmerer D, Karan C, Kidd M, Kim KM, Kim HC, Kunju LP, Langel U, Li Z, Lee J, Li H, LiVolsi V, Pfragner R, Rainey AR, Realubit RB, Remotti H, Regberg J, Roses R, Rustgi A, Sepulveda AR, Serra S, Shi C, Yuan X, Barberis M, Bergamaschi R, Chinnaiyan AM, Detre T, Ezzat S, Frilling A, Hommann M, Jaeger D, Kim MK, Knudsen BS, Kung AL, Leahy E, Metz DC, Milsom JW, Park YS, Reidy-Lagunes D, Schreiber S, Washington K, Wiedenmann B, Modlin I, Califano A. A precision oncology approach to the pharmacological targeting of mechanistic dependencies in neuroendocrine tumors. *Nature genetics*. 2018;50(7):979-89. Epub 2018/06/20. doi: 10.1038/s41588-018-0138-4. PubMed PMID: 29915428; PubMed Central PMCID: PMC6421579.
31. Garcia-Carbonero R, Capdevila J, Crespo-Herrero G, Diaz-Perez JA, Martinez Del Prado MP, Alonso Orduna V, Sevilla-Garcia I, Villabona-Artero C, Beguiristain-Gomez A, Llanos-Munoz M, Marazuela M, Alvarez-Escola C, Castellano D, Vilar E, Jimenez-Fonseca P, Teule A, Sastre-Valera J, Benavent-Vinuelas M, Monleon A, Salazar R. Incidence, patterns of care and prognostic factors for outcome of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs): results from the National Cancer Registry of Spain (RGETNE). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21(9):1794-803. Epub 2010/02/09. doi: 10.1093/annonc/mdq022. PubMed PMID: 20139156.
32. Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, Lloyd RV, Suster S. The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas*. 2010;39(6):707-12. Epub 2010/07/29. doi: 10.1097/MPA.0b013e3181ec124e. PubMed PMID: 20664470.
33. Anlauf M, Gerlach P, Schott M, Raffel A, Krausch M, Knoefel WT, Pavel M,

- Kloppel G. [Pathology of neuroendocrine neoplasms]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin*. 2011;82(7):567-73. Epub 2011/04/14. doi: 10.1007/s00104-011-2067-y. PubMed PMID: 21487814.
34. Rindi G, Klersy C, Albarello L, Baudin E, Bianchi A, Buchler MW, Caplin M, Couvelard A, Cros J, de Herder WW, Delle Fave G, Doglioni C, Federspiel B, Fischer L, Fusai G, Gavazzi F, Hansen CP, Inzani F, Jann H, Komminoth P, Knigge UP, Landoni L, La Rosa S, Lawlor RT, Luong TV, Marinoni I, Panzuto F, Pape UF, Partelli S, Perren A, Rinzivillo M, Rubini C, Ruzsniwski P, Scarpa A, Schmitt A, Schinzari G, Scoazec JY, Sessa F, Solcia E, Spaggiari P, Toumpanakis C, Vanoli A, Wiedenmann B, Zamboni G, Zandee WT, Zerbi A, Falconi M. Competitive Testing of the WHO 2010 versus the WHO 2017 Grading of Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms: Data from a Large International Cohort Study. *Neuroendocrinology*. 2018;107(4):375-86. Epub 2018/10/10. doi: 10.1159/000494355. PubMed PMID: 30300897.
 35. Rindi G, Klimstra DS, Abedi-Ardekani B, Asa SL, Bosman FT, Brambilla E, Busam KJ, de Krijger RR, Dietel M, El-Naggar AK, Fernandez-Cuesta L, Kloppel G, McCluggage WG, Moch H, Ohgaki H, Rakha EA, Reed NS, Rous BA, Sasano H, Scarpa A, Scoazec JY, Travis WD, Tallini G, Trouillas J, van Krieken JH, Cree IA. A common classification framework for neuroendocrine neoplasms: an International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO) expert consensus proposal. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2018;31(12):1770-86. Epub 2018/08/25. doi: 10.1038/s41379-018-0110-y. PubMed PMID: 30140036; PubMed Central PMCID: PMC6265262.
 36. Pavel M, Öberg K, Falconi M, Krenning E, Sundin A, Perren A, Berruti A. Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2020.
 37. Kloppel G, Perren A, Heitz PU. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2004;1014:13-27. Epub 2004/05/22. PubMed PMID: 15153416.
 38. Modlin IM, Shapiro MD, Kidd M. Siegfried Oberndorfer: origins and perspectives of carcinoid tumors. *Human pathology*. 2004;35(12):1440-51. Epub 2004/12/25. PubMed PMID: 15619202.

39. Araujo PB, Cheng S, Mete O, Serra S, Morin E, Asa SL, Ezzat S. Evaluation of the WHO 2010 grading and AJCC/UICC staging systems in prognostic behavior of intestinal neuroendocrine tumors. *PloS one*. 2013;8(4):e61538. Epub 2013/04/27. doi: 10.1371/journal.pone.0061538. PubMed PMID: 23620762; PubMed Central PMCID: PMC3631242.
40. Pape UF, Jann H, Muller-Nordhorn J, Bockelbrink A, Berndt U, Willich SN, Koch M, Rocken C, Rindi G, Wiedenmann B. Prognostic relevance of a novel TNM classification system for upper gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer*. 2008;113(2):256-65. Epub 2008/05/29. doi: 10.1002/cncr.23549. PubMed PMID: 18506737.
41. Kloppel G, Rindi G, Perren A, Komminoth P, Klimstra DS. The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: a statement. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2010;456(6):595-7. Epub 2010/04/28. doi: 10.1007/s00428-010-0924-6. PubMed PMID: 20422210.
42. Rindi G, Kloppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, Eriksson B, Falchetti A, Falconi M, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2006;449(4):395-401. Epub 2006/09/13. doi: 10.1007/s00428-006-0250-1. PubMed PMID: 16967267; PubMed Central PMCID: PMC1888719.
43. Rindi G, Kloppel G, Couvelard A, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B. TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2007;451(4):757-62. Epub 2007/08/04. doi: 10.1007/s00428-007-0452-1. PubMed PMID: 17674042.
44. Modlin IM, Gustafsson BI, Moss SF, Pavel M, Tsolakis AV, Kidd M. Chromogranin A—biological function and clinical utility in neuro endocrine tumor disease. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(9):2427-43.
45. Corti A. Chromogranin A and the tumor microenvironment. *Cellular and molecular neurobiology*. 2010;30(8):1163-70. Epub 2010/11/17. doi:

- 10.1007/s10571-010-9587-8. PubMed PMID: 21080056.
46. Nobels FR, Kwekkeboom DJ, Bouillon R, Lamberts SW. Chromogranin A: its clinical value as marker of neuroendocrine tumours. *European journal of clinical investigation*. 1998;28(6):431-40. Epub 1998/08/07. PubMed PMID: 9693933.
 47. Elias S, Delestre C, Courel M, Anouar Y, Montero-Hadjadje M. Chromogranin A as a crucial factor in the sorting of peptide hormones to secretory granules. *Cellular and molecular neurobiology*. 2010;30(8):1189-95. Epub 2010/11/04. doi: 10.1007/s10571-010-9595-8. PubMed PMID: 21046450.
 48. Gut P, Czarnywojtek A, Fischbach J, Baczyk M, Ziemnicka K, Wrotkowska E, Gryczynska M, Ruchala M. Chromogranin A - unspecific neuroendocrine marker. Clinical utility and potential diagnostic pitfalls. *Archives of medical science : AMS*. 2016;12(1):1-9. Epub 2016/03/01. doi: 10.5114/aoms.2016.57577. PubMed PMID: 26925113; PubMed Central PMCID: PMC4754364.
 49. Bajetta E, Ferrari L, Martinetti A, Celio L, Procopio G, Artale S, Zilembo N, Di Bartolomeo M, Seregni E, Bombardieri E. Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patients with neuroendocrine tumors. *Cancer*. 1999;86(5):858-65. Epub 1999/08/27. PubMed PMID: 10463986.
 50. Seregni E, Ferrari L, Bajetta E, Martinetti A, Bombardieri E. Clinical significance of blood chromogranin A measurement in neuroendocrine tumours. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2001;12 Suppl 2:S69-72. Epub 2002/01/05. PubMed PMID: 11762355.
 51. Modlin IM, Kidd M, Latich I, Zikusoka MN, Shapiro MD. Current status of gastrointestinal carcinoids. *Gastroenterology*. 2005;128(6):1717-51. Epub 2005/05/12. PubMed PMID: 15887161.
 52. Nobels FR, Kwekkeboom DJ, Coopmans W, Schoenmakers CH, Lindemans J, De Herder WW, Krenning EP, Bouillon R, Lamberts SW. Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the alpha-subunit of glycoprotein hormones. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(8):2622-8. Epub 1997/08/01. PubMed PMID: 9253344.
 53. Oberg K. Circulating biomarkers in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocrine-related cancer*. 2011;18 Suppl 1:S17-25. Epub 2011/10/26.

- doi: 10.1530/ERC-10-0280. PubMed PMID: 22005113.
54. Baudin E, Gigliotti A, Ducreux M, Ropers J, Comoy E, Sabourin JC, Bidart JM, Cailleux AF, Bonacci R, Ruffie P, Schlumberger M. Neuron-specific enolase and chromogranin A as markers of neuroendocrine tumours. *British journal of cancer*. 1998;78(8):1102-7. Epub 1998/10/29. PubMed PMID: 9792158; PubMed Central PMCID: PMC2063160.
 55. Welin S, Stridsberg M, Cunningham J, Granberg D, Skogseid B, Oberg K, Eriksson B, Janson ET. Elevated plasma chromogranin A is the first indication of recurrence in radically operated midgut carcinoid tumors. *Neuroendocrinology*. 2009;89(3):302-7. Epub 2009/01/30. doi: 10.1159/000179900. PubMed PMID: 19176944.
 56. Pregun I, Herszenyi L, Juhasz M, Miheller P, Hritz I, Patocs A, Racz K, Tulassay Z. Effect of proton-pump inhibitor therapy on serum chromogranin a level. *Digestion*. 2011;84(1):22-8. Epub 2011/02/10. doi: 10.1159/000321535. PubMed PMID: 21304238.
 57. Vezzosi D, Walter T, Laplanche A, Raoul JL, Dromain C, Ruszniewski P, d'Herbomez M, Guigay J, Mitry E, Cadiot G, Leboulleux S, Lombard-Bohas C, Borson-Chazot F, Ducreux M, Baudin E. Chromogranin A measurement in metastatic well-differentiated gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinoma: screening for false positives and a prospective follow-up study. *The International journal of biological markers*. 2011;26(2):94-101. Epub 2011/05/17. doi: 10.5301/JBM.2011.8327. PubMed PMID: 21574156.
 58. Takiyyuddin MA, Cervenka JH, Hsiao RJ, Barbosa JA, Parmer RJ, O'Connor DT. Chromogranin A. Storage and release in hypertension. *Hypertension*. 1990;15(3):237-46. Epub 1990/03/01. PubMed PMID: 2406199.
 59. Stridsberg M, Eriksson B, Oberg K, Janson ET. A comparison between three commercial kits for chromogranin A measurements. *The Journal of endocrinology*. 2003;177(2):337-41. Epub 2003/05/13. PubMed PMID: 12740022.
 60. de Herder WW. Biochemistry of neuroendocrine tumours. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2007;21(1):33-41. Epub 2007/03/27. doi: 10.1016/j.beem.2006.12.002. PubMed PMID: 17382264.
 61. Zuetenhorst JM, Taal BG. Metastatic carcinoid tumors: a clinical review. *The*

- oncologist. 2005;10(2):123-31. Epub 2005/02/15. doi: 10.1634/theoncologist.10-2-123. PubMed PMID: 15709214.
62. Joish VN, Shah S, Tierce JC, Patel D, McKee C, Lapuerta P, Zacks J. Serotonin levels and 1-year mortality in patients with neuroendocrine tumors: a systematic review and meta-analysis. *Future oncology*. 2019;15(12):1397-406. Epub 2019/02/09. doi: 10.2217/fon-2018-0960. PubMed PMID: 30734573.
 63. Sarrouilhe D, Clarhaut J, Defamie N, Mesnil M. Serotonin and cancer: what is the link? *Current molecular medicine*. 2015;15(1):62-77. Epub 2015/01/21. PubMed PMID: 25601469.
 64. Svejda B, Kidd M, Timberlake A, Harry K, Kazberouk A, Schimmack S, Lawrence B, Pfragner R, Modlin IM. Serotonin and the 5-HT7 receptor: the link between hepatocytes, IGF-1 and small intestinal neuroendocrine tumors. *Cancer science*. 2013;104(7):844-55. Epub 2013/04/13. doi: 10.1111/cas.12174. PubMed PMID: 23578138.
 65. Modlin IM, Kidd M, Bodei L, Drozdov I, Aslanian H. The clinical utility of a novel blood-based multi-transcriptome assay for the diagnosis of neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. *The American journal of gastroenterology*. 2015;110(8):1223-32. Epub 2015/06/03. doi: 10.1038/ajg.2015.160. PubMed PMID: 26032155.
 66. Wren Laboratories LLC. NETest® A Non-Invasive, Test Service for Neuroendocrine Tumor Patients. [Web page]. [updated 14.5.2020]. Available from: <https://www.wrenlaboratories.com/>.
 67. Pavel M, Jann H, Prasad V, Drozdov I, Modlin IM, Kidd M. NET Blood Transcript Analysis Defines the Crossing of the Clinical Rubicon: When Stable Disease Becomes Progressive. *Neuroendocrinology*. 2017;104(2):170-82. Epub 2016/04/15. doi: 10.1159/000446025. PubMed PMID: 27078712.
 68. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine*. 1995;1(1):27-31. Epub 1995/01/01. PubMed PMID: 7584949.
 69. Cuny T, de Herder W, Barlier A, Hofland LJ. Role of the tumor microenvironment in digestive neuroendocrine tumors. *Endocrine-related cancer*. 2018;25(11):R519-R44. Epub 2018/10/12. doi: 10.1530/ERC-18-0025. PubMed PMID: 30306777.
 70. Teule A, Casanovas O. Relevance of angiogenesis in neuroendocrine tumors.

- Targeted oncology. 2012;7(2):93-8. Epub 2012/05/18. doi: 10.1007/s11523-012-0217-x. PubMed PMID: 22592949.
71. Scoazec JY. Angiogenesis in neuroendocrine tumors: therapeutic applications. *Neuroendocrinology*. 2013;97(1):45-56. Epub 2012/04/28. doi: 10.1159/000338371. PubMed PMID: 22538258.
 72. Berardi R, Torniai M, Partelli S, Rubini C, Pagliaretta S, Savini A, Polenta V, Santoni M, Giampieri R, Onorati S, Barucca F, Murrone A, Bianchi F, Falconi M. Impact of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) single nucleotide polymorphisms on outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *PloS one*. 2018;13(5):e0197035. Epub 2018/05/23. doi: 10.1371/journal.pone.0197035. PubMed PMID: 29787601; PubMed Central PMCID: PMC5963762.
 73. Terris B, Scoazec JY, Rubbia L, Bregeaud L, Pepper MS, Ruzniewski P, Belghiti J, Flejou J, Degott C. Expression of vascular endothelial growth factor in digestive neuroendocrine tumours. *Histopathology*. 1998;32(2):133-8. Epub 1998/04/17. PubMed PMID: 9543669.
 74. Wiedenmann B, Pavel M, Kos-Kudla B. From Targets to Treatments: A Review of Molecular Targets in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology*. 2011. Epub 2011/09/07. doi: 10.1159/000329386. PubMed PMID: 21893937.
 75. Cigrovski Berkovic M, Cacev T, Catela Ivkovic T, Marout J, Ulamec M, Zjacic-Rotkvic V, Kapitanovic S. High VEGF serum values are associated with locoregional spread of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs). *Molecular and cellular endocrinology*. 2016. Epub 2016/01/26. doi: 10.1016/j.mce.2016.01.013. PubMed PMID: 26805636.
 76. Zhang J, Jia Z, Li Q, Wang L, Rashid A, Zhu Z, Evans DB, Vauthey JN, Xie K, Yao JC. Elevated expression of vascular endothelial growth factor correlates with increased angiogenesis and decreased progression-free survival among patients with low-grade neuroendocrine tumors. *Cancer*. 2007;109(8):1478-86. Epub 2007/03/07. doi: 10.1002/cncr.22554. PubMed PMID: 17340592.
 77. Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, Valle J, Metrakos P, Smith D, Vinik A, Chen JS, Horsch D, Hammel P, Wiedenmann B, Van Cutsem E, Patyna S, Lu DR, Blanckmeister C, Chao R, Ruzniewski P. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *The New*

- England journal of medicine. 2011;364(6):501-13. Epub 2011/02/11. doi: 10.1056/NEJMoa1003825. PubMed PMID: 21306237.
78. Ribatti D. The controversial role of placental growth factor in tumor growth. *Cancer letters*. 2011;307(1):1-5. Epub 2011/03/25. doi: 10.1016/j.canlet.2011.02.043. PubMed PMID: 21429661.
79. Kim KJ, Cho CS, Kim WU. Role of placenta growth factor in cancer and inflammation. *Experimental & molecular medicine*. 2012;44(1):10-9. Epub 2012/01/06. doi: 10.3858/emm.2012.44.1.023. PubMed PMID: 22217448; PubMed Central PMCID: PMC3277893.
80. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nature reviews Cancer*. 2008;8(12):942-56. Epub 2008/11/26. doi: 10.1038/nrc2524. PubMed PMID: 19029957.
81. Adini A, Kornaga T, Firoozbakht F, Benjamin LE. Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer research*. 2002;62(10):2749-52. Epub 2002/05/23. PubMed PMID: 12019148.
82. Lutun A, Autiero M, Tjwa M, Carmeliet P. Genetic dissection of tumor angiogenesis: are PlGF and VEGFR-1 novel anti-cancer targets? *Biochimica et biophysica acta*. 2004;1654(1):79-94. Epub 2004/02/27. doi: 10.1016/j.bbcan.2003.09.002. PubMed PMID: 14984769.
83. Bellik L, Vinci MC, Filippi S, Ledda F, Parenti A. Intracellular pathways triggered by the selective FLT-1-agonist placental growth factor in vascular smooth muscle cells exposed to hypoxia. *British journal of pharmacology*. 2005;146(4):568-75. Epub 2005/08/09. doi: 10.1038/sj.bjp.0706347. PubMed PMID: 16086034; PubMed Central PMCID: PMC1751184.
84. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendrikx J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nature medicine*. 2002;8(8):841-9. Epub 2002/07/02. doi: 10.1038/nm740. PubMed PMID: 12091880; PubMed Central PMCID: PMC2779715.
85. Li B, Sharpe EE, Maupin AB, Teleron AA, Pyle AL, Carmeliet P, Young PP. VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment

- and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2006;20(9):1495-7. Epub 2006/06/07. doi: 10.1096/fj.05-5137fje. PubMed PMID: 16754748.
86. Marcellini M, De Luca N, Riccioni T, Ciucci A, Orecchia A, Lacal PM, Ruffini F, Pesce M, Cianfarani F, Zambruno G, Orlandi A, Failla CM. Increased melanoma growth and metastasis spreading in mice overexpressing placenta growth factor. *The American journal of pathology*. 2006;169(2):643-54. Epub 2006/08/01. doi: 10.2353/ajpath.2006.051041. PubMed PMID: 16877362; PubMed Central PMCID: PMC1698793.
 87. Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J, Risau W. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *The Journal of biological chemistry*. 1996;271(30):17629-34. Epub 1996/07/26. PubMed PMID: 8663424.
 88. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Shibuya M, Collen D, Conway EM, Carmeliet P. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nature medicine*. 2003;9(7):936-43. Epub 2003/06/11. doi: 10.1038/nm884. PubMed PMID: 12796773.
 89. Tjwa M, Luttun A, Autiero M, Carmeliet P. VEGF and PlGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis. *Cell and tissue research*. 2003;314(1):5-14. Epub 2003/09/19. doi: 10.1007/s00441-003-0776-3. PubMed PMID: 13680354.
 90. Snuderl M, Batista A, Kirkpatrick ND, Ruiz de Almodovar C, Riedemann L, Walsh EC, Anolik R, Huang Y, Martin JD, Kamoun W, Knevels E, Schmidt T, Farrar CT, Vakoc BJ, Mohan N, Chung E, Roberge S, Peterson T, Bais C, Zhelyazkova BH, Yip S, Hasselblatt M, Rossig C, Niemeyer E, Ferrara N, Klagsbrun M, Duda DG, Fukumura D, Xu L, Carmeliet P, Jain RK. Targeting placental growth factor/neuropilin 1 pathway inhibits growth and spread of medulloblastoma. *Cell*. 2013;152(5):1065-76. Epub 2013/03/05. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.036. PubMed

PMID: 23452854; PubMed Central PMCID: PMC3587980.

91. Pompeo E, Albonici L, Doldo E, Orlandi A, Manzari V, Modesti A, Mineo TC. Placenta growth factor expression has prognostic value in malignant pleural mesothelioma. *The Annals of thoracic surgery*. 2009;88(2):426-31. Epub 2009/07/28. doi: 10.1016/j.athoracsur.2009.04.038. PubMed PMID: 19632388.
92. Escudero-Esparza A, Martin TA, Davies ML, Jiang WG. PGF isoforms, PLGF-1 and PGF-2, in colorectal cancer and the prognostic significance. *Cancer genomics & proteomics*. 2009;6(4):239-46. Epub 2009/08/07. PubMed PMID: 19657001.
93. Wei SC, Tsao PN, Yu SC, Shun CT, Tsai-Wu JJ, Wu CH, Su YN, Hsieh FJ, Wong JM. Placenta growth factor expression is correlated with survival of patients with colorectal cancer. *Gut*. 2005;54(5):666-72. Epub 2005/04/16. doi: 10.1136/gut.2004.050831. PubMed PMID: 15831913; PubMed Central PMCID: PMC1774482.
94. Eriksson A, Cao R, Pawliuk R, Berg SM, Tsang M, Zhou D, Fleet C, Tritsarlis K, Dissing S, Leboulch P, Cao Y. Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PIGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer cell*. 2002;1(1):99-108. Epub 2002/06/28. PubMed PMID: 12086892.
95. Shibuya M. Involvement of Flt-1 (VEGF receptor-1) in cancer and preeclampsia. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences*. 2011;87(4):167-78. Epub 2011/05/12. PubMed PMID: 21558755; PubMed Central PMCID: PMC3149381.
96. Wu FT, Stefanini MO, Mac Gabhann F, Kontos CD, Annex BH, Popel AS. A systems biology perspective on sVEGFR1: its biological function, pathogenic role and therapeutic use. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010;14(3):528-52. Epub 2009/10/21. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00941.x. PubMed PMID: 19840194; PubMed Central PMCID: PMC3039304.
97. Pavel ME, Sers C. WOMEN IN CANCER THEMATIC REVIEW: Systemic therapies in neuroendocrine tumors and novel approaches toward personalized medicine. *Endocrine-related cancer*. 2016;23(11):T135-T54. Epub 2016/09/22. doi: 10.1530/ERC-16-0370. PubMed PMID: 27649723.
98. Frost M, Lines KE, Thakker RV. Current and emerging therapies for PNETs in

- patients with or without MEN1. *Nature reviews Endocrinology*. 2018;14(4):216-27. Epub 2018/02/17. doi: 10.1038/nrendo.2018.3. PubMed PMID: 29449689; PubMed Central PMCID: PMC6538535.
99. Mateo J, Heymach JV, Zurita AJ. Circulating Biomarkers of Response to Sunitinib in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Molecular diagnosis & therapy*. 2012;16(3):151-61.
 100. Jiménez-Fonseca P, Martín MN, Carmona-Bayonas A, Calvo A, Fernández-Mateos J, Redrado M, Capdevila J, Lago NM, Lacasta A, Muñarriz J. Biomarkers and polymorphisms in pancreatic neuroendocrine tumors treated with sunitinib. *Oncotarget*. 2018;9(97):36894.
 101. Yao JC, Pavel M, Lombard-Bohas C, Van Cutsem E, Voi M, Brandt U, He W, Chen D, Capdevila J, de Vries EGE, Tomassetti P, Hobday T, Pommier R, Oberg K. Everolimus for the Treatment of Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Overall Survival and Circulating Biomarkers From the Randomized, Phase III RADIANT-3 Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(32):3906-13. Epub 2016/09/14. doi: 10.1200/JCO.2016.68.0702. PubMed PMID: 27621394; PubMed Central PMCID: PMC5791842.
 102. Strosberg J, Kvolts L. Antiproliferative effect of somatostatin analogs in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2010;16(24):2963-70. Epub 2010/06/24. PubMed PMID: 20572298; PubMed Central PMCID: PMC2890935.
 103. Rossana B, Silvia R, Mariangela T, Francesca M, Stefano P, Miriam C, Azzurra O, Vanessa P, Silvia P, Massimo F, Stefano C. Gastrointestinal neuroendocrine tumors: Searching the optimal treatment strategy-A literature review. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2016;98:264-74. Epub 2015/12/09. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.11.003. PubMed PMID: 26643525.
 104. Rinke A, Muller HH, Schade-Brittinger C, Klose KJ, Barth P, Wied M, Mayer C, Aminossadati B, Pape UF, Blaker M, Harder J, Arnold C, Gress T, Arnold R. Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*.

- 2009;27(28):4656-63. Epub 2009/08/26. doi: 10.1200/JCO.2009.22.8510. PubMed PMID: 19704057.
105. Caplin ME, Pavel M, Cwikla JB, Phan AT, Raderer M, Sedlackova E, Cadiot G, Wolin EM, Capdevila J, Wall L, Rindi G, Langley A, Martinez S, Gomez-Panzani E, Ruzzniewski P, Investigators C. Anti-tumour effects of lanreotide for pancreatic and intestinal neuroendocrine tumours: the CLARINET open-label extension study. *Endocrine-related cancer*. 2016;23(3):191-9. Epub 2016/01/09. doi: 10.1530/ERC-15-0490. PubMed PMID: 26743120; PubMed Central PMCID: PMC4740728.
 106. DAKO GmbH. Chromogranin A ELISA Kit. [Web Page]. [updated 01.07.2015]. Available from: http://www.dako.com/chromogranin_a_brochure-29006-01dec2011_print_highres.pdf.
 107. van der Knaap R, Kwekkeboom D, Ramakers C, de Rijke Y. Evaluation of a new immunoassay for chromogranin A measurement on the Kryptor system. *Practical Laboratory Medicine*. 2015;1:5-11.
 108. Degorce F, Goumon Y, Jacquemart L, Vidaud C, Bellanger L, Pons-Anicet D, Seguin P, Metz-Boutigue MH, Aunis D. A new human chromogranin A (CgA) immunoradiometric assay involving monoclonal antibodies raised against the unprocessed central domain (145-245). *British journal of cancer*. 1999;79(1):65-71. Epub 1999/07/17. doi: 10.1038/sj.bjc.6690013. PubMed PMID: 10408695; PubMed Central PMCID: PMC2362168.
 109. CIS bio GmbH. Chromogranin A (CGA) immunoradiometric assay kit. [Web Page]. [updated 01.07.2015]. Available from: <http://www.cisbio.com/other/diagnostics/products/oncology/chromogranin-cga-immunoradiometric-assay-kit>.
 110. Euro Diagnostica AB. EURIA Chromogranin A und Chromogranin B. [Web Page]. [updated 02.07.2015]. Available from: http://www.eurodiagnostica.com/upload/files/product/Chromogranin_RIA_DE_Screen120925.pdf.
 111. Schiettecatte J, Russcher H, Anckaert E, Mees M, Leeser B, Tirelli AS, Fiedler GM, Luthe H, Denk B, Smitz J. Multicenter evaluation of the first automated Elecsys sFlt-1 and PIGF assays in normal pregnancies and preeclampsia. *Clinical biochemistry*. 2010;43(9):768-70. Epub 2010/03/09. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2010.02.010. PubMed PMID: 20206155.
 112. Roche. Elecsys® proBNP. [Web Page]. [updated 20.02.2016]. Available from:

<https://www.roche.de/diagnostics/tests-parameter/klinische-chemie-immundiagnostik/nt-pro-bnp.html#Merkmale>.

113. Ferrari L, Seregni E, Lucignani G, Bajetta E, Martinetti A, Aliberti G, Pallotti F, Procopio G, Della Torre S, Luksch R, Bombardieri E. Accuracy and clinical correlates of two different methods for chromogranin A assay in neuroendocrine tumors. *The International journal of biological markers*. 2004;19(4):295-304. Epub 2005/01/14. PubMed PMID: 15646836.
114. Zatelli MC, Torta M, Leon A, Ambrosio MR, Gion M, Tomassetti P, De Braud F, Delle Fave G, Dogliotti L, degli Uberti EC, Italian CromaNet Working G. Chromogranin A as a marker of neuroendocrine neoplasia: an Italian Multicenter Study. *Endocrine-related cancer*. 2007;14(2):473-82. Epub 2007/07/20. doi: 10.1677/ERC-07-0001. PubMed PMID: 17639060.
115. Belli SH, Oneto A, Aranda C, O'Connor JM, Domenichini E, Roca E, Mendez G, Bestani MC, Parma P, Giacomi N, Marmissolle F. Chromogranin A as a biochemical marker for the management of neuroendocrine tumors: a multicenter study developed in Argentina. *Acta gastroenterologica Latinoamericana*. 2009;39(3):184-9. Epub 2009/10/23. PubMed PMID: 19845257.
116. Eisenhauer E, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz L, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer*. 2009;45(2):228-47.
117. Nishino M, Jagannathan JP, Ramaiya NH, Van den Abbeele AD. Revised RECIST guideline version 1.1: What oncologists want to know and what radiologists need to know. *AJR American journal of roentgenology*. 2010;195(2):281-9. Epub 2010/07/24. doi: 10.2214/AJR.09.4110. PubMed PMID: 20651182.
118. Nolting S, Kuttner A, Lauseker M, Vogeser M, Haug A, Herrmann KA, Hoffmann JN, Spitzweg C, Goke B, Auernhammer CJ. Chromogranin a as serum marker for gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: a single center experience and literature review. *Cancers*. 2012;4(1):141-55. Epub 2012/01/01. doi: 10.3390/cancers4010141. PubMed PMID: 24213232; PubMed Central PMCID: PMC3712684.
119. Verbeek WH, Korse CM, Tesselaar ME. GEP-NETs UPDATE: Secreting gastro-

- enteropancreatic neuroendocrine tumours and biomarkers. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 2016;174(1):R1-7. Epub 2015/07/15. doi: 10.1530/EJE-14-0971. PubMed PMID: 26162406.
120. Arnold R, Wilke A, Rinke A, Mayer C, Kann PH, Klose KJ, Scherag A, Hahmann M, Muller HH, Barth P. Plasma chromogranin A as marker for survival in patients with metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumors. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2008;6(7):820-7. Epub 2008/06/13. doi: 10.1016/j.cgh.2008.02.052. PubMed PMID: 18547872.
121. Kölby L, Bernhardt P, Swärd C, Johanson V, Ahlman H, Forssell-Aronsson E, Stridsberg M, Wängberg B, Nilsson O. Chromogranin A as a determinant of midgut carcinoid tumour volume. *Regulatory peptides*. 2004;120(1):269-73.
122. Woltering EA, Hilton RS, Zolfoghary CM, Thomson J, Zietz S, Go VL, Vinik AI, Vinik E, O'Dorisio TM, Mamikunian G. Validation of serum versus plasma measurements of chromogranin a levels in patients with carcinoid tumors: lack of correlation between absolute chromogranin a levels and symptom frequency. *Pancreas*. 2006;33(3):250-4. Epub 2006/09/28. doi: 10.1097/01.mpa.0000235302.73615.d4. PubMed PMID: 17003646.
123. Kim M, Lee S, Lee J, Park SH, Park JO, Park YS, Kang WK, Kim ST. The Role of Plasma Chromogranin A as Assessment of Treatment Response in Non-functioning Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association*. 2016;48(1):153-61. Epub 2015/03/18. doi: 10.4143/crt.2014.183. PubMed PMID: 25779359; PubMed Central PMCID: PMC4720067.
124. Granberg D, Stridsberg M, Seensalu R, Eriksson B, Lundqvist G, Oberg K, Skogseid B. Plasma chromogranin A in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(8):2712-7. Epub 1999/08/12. PubMed PMID: 10443665.
125. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-57. Epub 2000/09/23. doi: 10.1038/35025220. PubMed PMID: 11001068.
126. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature medicine*. 1995;1(1):27-30.

127. Coenegrachts L, Schrauwen S, Van Bree R, Despierre E, Luyten C, Jonckx B, Stassen JM, Vergote I, Amant F. Increased expression of placental growth factor in high-grade endometrial carcinoma. *Oncology reports*. 2013;29(2):413-8. Epub 2012/12/13. doi: 10.3892/or.2012.2178. PubMed PMID: 23232836; PubMed Central PMCID: PMC3583572.
128. Chang YT, Chang MC, Wei SC, Tien YW, Hsu C, Liang PC, Tsao PN, Jan IS, Wong JM. Serum vascular endothelial growth factor/soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 ratio is an independent prognostic marker in pancreatic cancer. *Pancreas*. 2008;37(2):145-50. Epub 2008/07/31. doi: 10.1097/MPA.0b013e318164548a. PubMed PMID: 18665074.
129. Cheng SJ, Lee JJ, Cheng SL, Chen HM, Chang HH, Wang YP, Kok SH, Kuo MY, Chiang CP. Increased serum placenta growth factor level is significantly associated with progression, recurrence and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 2012;48(5):424-8. Epub 2012/01/17. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.12.007. PubMed PMID: 22244591.
130. Karges W. Molekulare und klinische Genetik neuroendokriner Tumoren des Gastrointestinaltrakts. *Der Onkologe*. 2004;10(6):580-7.
131. Rindi G, Bordi C. Highlights of the biology of endocrine tumours of the gut and pancreas. *Endocrine-related cancer*. 2003;10(4):427-36. Epub 2004/01/10. PubMed PMID: 14713255.
132. Nakamura T, Funayama H, Kubo N, Yasu T, Kawakami M, Momomura S, Ishikawa SE. Elevation of plasma placental growth factor in the patients with ischemic cardiomyopathy. *International journal of cardiology*. 2009;131(2):186-91. Epub 2008/01/15. doi: 10.1016/j.ijcard.2007.10.050. PubMed PMID: 18192038.
133. van Treijen MJC, Korse CM, van Leeuwen RS, Saveur LJ, Vriens MR, Verbeek WHM, Tesselaar MET, Valk GD. Blood Transcript Profiling for the Detection of Neuroendocrine Tumors: Results of a Large Independent Validation Study. *Frontiers in endocrinology*. 2018;9:740. Epub 2018/12/20. doi: 10.3389/fendo.2018.00740. PubMed PMID: 30564197; PubMed Central PMCID: PMC6288275.
134. Öberg K, Califano A, Strosberg JR, Ma S, Pape U, Bodei L, Kaltsas G, Toumpanakis C, Goldenring JR, Frilling A. A meta-analysis of the accuracy of a

- neuroendocrine tumor mRNA genomic biomarker (NETest) in blood. *Annals of Oncology*. 2020;31(2):202-12.
135. Wren Laboratories LLC. NETest® Sample Preparation. [Web page]. [updated 13.08.2020]. Available from: <https://www.wrenlaboratories.com/provider/netest@-sample-preparation>.
 136. Gregersen T, Gronbaek H, Worsoe J, Schlageter V, Laurberg S, Krogh K. Effects of Sandostatin LAR on gastrointestinal motility in patients with neuroendocrine tumors. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2011;46(7-8):895-902. Epub 2011/06/01. doi: 10.3109/00365521.2011.579157. PubMed PMID: 21623673.
 137. Wang YH, Yang QC, Lin Y, Xue L, Chen MH, Chen J. Chromogranin A as a marker for diagnosis, treatment, and survival in patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasm. *Medicine*. 2014;93(27):e247. Epub 2014/12/17. doi: 10.1097/MD.0000000000000247. PubMed PMID: 25501094; PubMed Central PMCID: PMC4602794.
 138. Tian T, Gao J, Li N, Li Y, Lu M, Li Z, Lu Z, Li J, Shen L. Circulating Chromogranin A as A Marker for Monitoring Clinical Response in Advanced Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *PloS one*. 2016;11(5):e0154679. Epub 2016/05/10. doi: 10.1371/journal.pone.0154679. PubMed PMID: 27159453; PubMed Central PMCID: PMC4861261.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Tabea Neumann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: “Prognostischer und prädiktiver Stellenwert von zirkulierenden Biomarkern bei neuroendokrinen Neoplasien verschiedenen Ursprungs” selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

04. Juni 2021

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Tabea Neumann hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Georg Hilfenhaus, Andreas Göhrig, Ulrich-Frank Pape, Tabea Neumann, Henning Jann, Dietmar Zdunek, Georg Hess, Jean Marie Stassen, Bertram Wiedemann, Katharina Detjen, Marianne Pavel, Christian Fischer, Placental growth factor supports neuroendocrine tumor growth and predicts disease prognosis in patients, Endocrine-Related Cancer, 2013

Beitrag:

Durch Frau Tabea Neumann erfolgten die Sammlung von Daten sowie die statistische Auswertung des klinischen Follow up für zwei Subkollektive des prospektiven Teilbereiches.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Publikation 1: Georg Hilfenhaus, Andreas Göhrig, Ulrich-Frank Pape, Tabea Neumann, Henning Jann, Dietmar Zdunek, Georg Hess, Jean Marie Stassen, Bertram Wiedemann, Katharina Detjen, Marianne Pavel, Christian Fischer, Placental growth factor supports neuroendocrine tumor growth and predicts disease prognosis in patients, *Endocrine-Related Cancer*, 2013

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich im Besonderen bei Frau Prof. Dr. Pavel und Frau Dr. Detjen bedanken für die nachhaltige Betreuung meiner Arbeit. Die unermüdliche Gabe konstruktiver Hinweise und Korrekturen trugen entscheidend zum Gelingen dieser Dissertation bei.

Einen herzlichen Dank gebührt auch Dr. Hilfenhaus, bei Ihnen fand ich Hilfe bei der statistischen Auswertung und Anregungen bei der Interpretation meiner Daten.

Des Weiteren schulde ich ferner Herrn Dr. Fischer einen Dank für die Überlassung von Daten einer Kontrollkohorte.

Überdies möchte ich mich für die freundliche Arbeitsatmosphäre im Studiensekretariat von Frau Lischewski bedanken.

Meinem Freund möchte ich für die emotionale Unterstützung und die verständnisvolle Geduld einen lieben Dank aussprechen.

Meinen größten Dank gilt jedoch meinen Eltern, bei denen ich beständig in allen Lebenslagen Unterstützung fand.