

Aus der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie, Rheumatologie der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Immunhistochemische Untersuchungen zur Bedeutung
Mitose-assoziiierter Kinasen des Chromosomal Passenger
Komplexes bei Gastroenteropankreatischen
Neuroendokrinen Neoplasien:
Potenzielles Target und innovative Ansätze in der
Diagnostik

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Yawen Wang
aus Beijing

Datum der Promotion: 03.12.2021

Meinen Eltern

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>Avidin-biotin-complex</i>
AIM-1	<i>Aurora- and IPL1-like midbody-associated protein 1</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische-Phosphatase
APUD	<i>Amine precursor uptake and decarboxylation</i>
ARUKB	Aurora Kinase B
BCR-ABL	<i>B-cell receptor</i>
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CT	Computertomografie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CPC	<i>Chromosomal passenger complex</i>
CUP	<i>Cancer of unknown primary</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinase</i>
F18-FDG-PET	F18- Fluorodeoxyglukose-Positronen-Emissionstomografie
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe
FOXM1	Forkhead Box M1
G	Grading
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
G1 Phase	Gap 1 Phase
68 GA-DOTA-TOC	68 Gallium-1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure-Tyrosin-Octreotid
GEP-NEN	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien
GEP-NET	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
INCENP	<i>Inner centromere protein</i>
JAK	Januskinase
MANEC	<i>Mixed adeno-neuroendocrine carcinoma</i>

MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEN	<i>Multiple endocrine neoplasm</i>
MIB-1	<i>Molecular Immunology Borstel</i>
MINEN	<i>Mixed neuroendocrine-nonneuroendocrine neoplasm</i>
M-Phase	Mitose-Phase
NCI	<i>National Cancer Institut</i>
NF1	Neurofibromatose 1
NEC	Neuroendokrines Karzinom
NEN	Neuroendokrine Neoplasie
NET	Neuroendokriner Tumor
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i>
P53	Protein 53
PDEC	Niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom
PET-CT	Positronen-Emissionscomputertomografie
PRRT	Peptidrezeptor vermittelte Radionuklidtherapie
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
ras	<i>Rat sarcoma</i>
rb1	Retinoblastom-Gen
RFA	Radiofrequenz-induzierte Thermoablation
SEER	<i>Surveillance Epidemiology and End Results Program</i>
SSTR	Somatostatinrezeptoren
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TK	Tyrosinkinase
TNM	<i>tumor, nodes, metastasis</i>
TTF-1	Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
US	<i>United States</i>
VIP	Vasoaktiv intestinales Peptid
WHO	<i>World Health Organisation</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikationsschema der neuroendokrinen Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems gemäß WHO	21
Tabelle 2: Übersicht über Lokalisation, Metastasen-Status, Gewebetyp, Tumorgroße, Funktionalität der G1-, G2- und G3-Tumore	37
Tabelle 3: Verwendete Antikörper, Verdünnung, Puffer und Färbemethode	39
Tabelle 4: Verwendete Positivkontrollen	40
Tabelle 5: Übersicht über Anzahl der Tumorpräparate	43
Tabelle 6: Alters- und Geschlechterverteilung inklusive Unterscheidung NET G3/NEC G3	48
Tabelle 7: Nukleäre Immunreaktivität von Aurora Kinase B in den G1-, G2- und G3- Gruppen	50
Tabelle 8: Zytoplasmatische Immunreaktivität von Aurora Kinase B in den G1-, G2- und vG3- Gruppen	52
Tabelle 9: Nukleäre Immunreaktivität von Survivin in den G1-, G2- und G3- Gruppen	54
Tabelle 10: Immunreaktivität von IGF-1R in den G1-, G2- und G3- Gruppen	56
Tabelle 11: Immunreaktivität von FOXM1 in den G1-, G2- und G3- Gruppen	58
Tabelle 12: Immunreaktivität von STAT3 und pSTAT3 in den G1-, G2- und G3- Gruppen	60
Tabelle 13: Tabellarische Zusammenfassung relevanter Ergebnisse der immunhistochemischen Korrelationsanalyse	61

Tabelle 14: Korrelation der Expression von Aurora Kinase B, Survivin, FOXM1 mit TumorgroÙe	62
Tabelle 15: Korrelation von Aurora Kinase B und Survivin im Kern mit der Funktionalität	63
Tabelle 16: Übersicht der positiven Immunreaktivität aller Zielstrukturen, sowie die statistische Signifikanz	64
Tabelle 17: Auflistung aller Patienten mit G3 NET und G3 NEC Tumoren (* STAT3 positiv in Lymphozyten)	71
Tabelle 18: Vorschlag zur histopathologischen Untersuchung in der Routineuntersuchung zur Charakterisierung der GEP-NEN	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der Interaktion zwischen Aurora B, INCENP und Survivin	27
Abbildung 2: Schematischer Aufbau von Aurora-A,-B, and -C Kinasen	28
Abbildung 3: Intra- und extrazelluläre Lokalisation von Survivin und seine Funktionen	30
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aktivierung und Regulation von IGF-1R	31
Abbildung 5: Signalkaskade der STAT3-Aktivität	33
Abbildung 6: Positive Immunreaktivität von Aurora Kinase B, Magen, G3	50
Abbildung 7: Positive zytosolische Immunreaktivität von Aurora Kinase B, Dünndarm	51
Abbildung 8: Positive nukleäre Immunreaktivität von Aurora Kinase B, Lebermetastase, G3	53
Abbildung 9: Positive membranöse Immunreaktivität von IGF-1R, Magen, G3	55
Abbildung 10: Positive Reaktivität von FOXM1 im Kern, Sigma, G3	57
Abbildung 11: Positive Immunreaktivität von STAT3 im Kern, Magen, G3	59
Abbildung 12: Positive Immunreaktivität von pSTAT3, Lebermetastase, G3	60

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1: Steigende Inzidenz der GEP-NEN in der US-Bevölkerung	19
Diagramm 2: Überlebensfunktion Grading	46
Diagramm 3: Überlebensfunktion Metastasenstatus	47
Diagramm 4: Häufigkeit der Grading-Verteilung innerhalb des Kollektivs	48
Diagramm 5: Aurora Kinase B im Zytosol und Nukleus in inverser Wechselbeziehung	52
Diagramm 6: Survivin-Expression im Kern in G1, G2 und G3 NENs	54
Diagramm 7: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der Expression von Aurora Kinase B im Nukleus	66
Diagramm 8: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der Expression von Aurora Kinase B im Zytosol	67
Diagramm 9: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von Survivin im Nukleus	68
Diagramm 10: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von IGF-1R-Expression	69

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
Diagrammverzeichnis	9
Abstract Deutsch	14
Abstract Englisch	16
1. Einleitung	18
1.1 Gastroenteropankreatische Neuroendokrine Tumore	18
1.2 Epidemiologie	18
1.3 Nomenklatur und Klassifikation	20
1.3.1 Geschichte der Klassifikation	20
1.3.2 Aktuelle Klassifikation	21
1.4 Diagnostik und Therapie	22
1.4.1 Diagnostik	22
1.4.2 Therapie	23
1.5 Prädiktive Biomarker	25
1.5.1 Ki-67 (MIB-1)	26
1.6 Mitose-assoziierte Kinasen	26
1.6.1 Aurora Kinase B	26

1.6.2 Survivin	28
1.7. Faktoren des Signalweges	30
1.7.1 Insulin-like Growth Factor-1 Rezeptor (IGF-1R)	30
1.7.2 Forkhead Box M1 (FOXM1)	32
1.7.3 Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)	32
2. Fragestellung und Zielsetzung	34
3. Material und Methoden	35
3.1 Material	35
3.1.1 Patientenkollektiv	35
3.1.2 Klinisch-pathologische Daten	36
3.1.3 Chemikalien und Geräte	38
3.1.4 Antikörper	39
3.2 Methodik	39
3.2.1 Behandlung des Tumormaterials	39
3.2.2 Immunhistochemie	41
3.2.3 Durchführung	41
3.3 Auswertung und Quantifizierung	43
3.3.1 Auswertung am Mikroskop	43
3.3.2 Statistische Auswertung	45
4. Ergebnisse	46
4.1 Plausibilitätsprüfung des Patientenkollektivs	46
4.2 Deskriptive Statistik	48

4.2.1 Grading-, Geschlechter-, Altersverteilung	48
4.3 Immunreaktivität und Expressionsverhalten	49
4.3.1 Expressionsverhalten von Aurora Kinase B in GEP-NEN	49
4.3.2 Expressionsverhalten von Survivin in GEP-NEN	53
4.3.3 Expressionsverhalten von IGF-1R in GEP-NEN	55
4.3.4 Expressionsverhalten von FOXM1 in GEP-NEN	57
4.3.5 Expressionsverhalten von STAT3 und pSTAT3 in GEP-NEN	59
4.4 Korrelationen im Expressionsverhalten	61
4.5 Korrelationen des Expressionsverhaltens mit klinischen Parametern	61
4.5.1 Tumorgröße	62
4.5.2 Metastasen	62
4.5.3 Funktionalität	63
4.5.4 Grading	63
4.6 Multivariate Analysen	65
4.7 Expressionsverhalten in Korrelation mit Überleben	65
4.8 Individuelle Krankheitsverläufe bei G3 NECs	70
5. Diskussion	72
5.1 Beurteilung der Methodik und Auswertung	73
5.2 Interpretation der Ergebnisse	75
5.3 Klinische Relevanz	80
6. Zusammenfassung	83
Literaturverzeichnis	85

Eidesstattliche Versicherung	98
Anteilserklärung	99
Lebenslauf	101
Publikationsliste	106
Danksagung	111

Abstract Deutsch

Immunhistochemische Untersuchungen zur Bedeutung Mitose-assoziiierter Kinasen des Chromosomal Passenger Komplexes bei Gastroenteropankreatischen Neuroendokrinen Neoplasien: Potenzielles Target und innovative Ansätze in der Diagnostik

Einleitung

Die Gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NENs) stellen eine seltene, aber zunehmende Tumorentität dar. Diese heterogene Tumorgruppe weist unterschiedliches Wachstumsverhalten auf. Aufgrund der breiten biologischen Heterogenität hinsichtlich Krankheitsverlauf und Prognose stellt die Behandlung eine große Herausforderung dar. So können metastasierte NENs beispielsweise jahrelang klinisch kontrollierbar bleiben, im späteren Stadium aber einen fulminanten Verlauf annehmen. In diesem Zusammenhang ist nach wie vor die Frage nach prädiktiven Biomarkern von besonderem Stellenwert. Die vorliegende Arbeit untersucht in diesem Zusammenhang das Expressionsverhalten Mitose-relevanter Kinasen des Chromosomal Passenger Komplexes.

Methode

Das Expressionsverhalten von Survivin, Aurora Kinase B, FOXM1, IGF-1R, STAT3 und pSTAT3 wurde immunhistochemisch untersucht. Relevante Verlaufsinformationen über Tumorprogress, Sterbedatum und Todesursache wurden in einem gut definierten Kollektiv mit 75 Patienten erhoben. In der statistischen Untersuchung wurde das Expressionsverhalten der untersuchten Kinasen hinsichtlich Grading ausgewertet. Die prognostische Bedeutung der Expression wurde anhand des 5-Jahres-Follow ups statistisch errechnet.

Ergebnisse

Zytoplasmatische Aurora B- Expression wurde ausschließlich in G1/G2-Tumoren nachgewiesen, nukleäre Expression dagegen in G3- Tumoren. Zudem wurde eine hohe FOXM1 Co-Expression bei G3 NECs nachgewiesen. Die Marker zeigten eine signifikante Korrelation zueinander und sind mit einer schlechten Prognose verbunden.

Die Expression von Aurora Kinase B im Kern ist direkt mit dem Differenzierungsgrad, Tumorprogression und Aggressivität einer GEP-NEN- Erkrankung, sowie mit der Überexpression anderer Regulatoren der Mitose assoziiert, inklusive Survivin im Kern und FOXM1.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig das Expressionsverhalten von Aurora B und deren Co-Regulatoren bei GEP-NETs untersucht. Der routinemäßige Nachweis dieser Parameter als Set erscheint biologisch relevanter als Ki-67 allein und kann die Individualisierung der Therapiestrategien bei GEP-NENs erleichtern. Eine bessere Beschreibung der heterogenen G3-Tumore als G3 NET und G3 NEC kann so die Subgruppen besser definieren.

Abstract Englisch

Immunohistochemical Studies of Novel Promising Targets of the Chromosomal Passenger Complex in Gastroenteropancreatic Neoplasms

Objective

Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms (GEP-NENs) are rare and heterogeneous in their tumor biology. The growth pattern ranges from well-differentiated to fast growing, undifferentiated aggressive types of carcinomas. Therapeutic options to prevent growth and dissemination of GEP-NENs are still not satisfactory. Members of the chromosomal passenger complex play a role in cell cycle progression. Aberrant expression occurs in different solid tumor entities. Little is known about their functional role in GEP-NENs. The aim of this study is to study their expression in human GEP-NENs.

Methods

Tumor tissues from 75 patients were studied immunohistochemically with Anti-Survivin and AIM 1 antibody. Furthermore the expression of FOXM1, IGF-1R, STAT3 and pSTAT3 was also examined by performing immunohistochemistry. The expression pattern was correlated with follow-up data such as tumor progression, time of death and cause of death. The prognostic significance of expression was statistically calculated using 5-year follow-up.

Results

The immunohistochemical analysis of Survivin and Aurora Kinase B revealed a nuclear overexpression in a significant portion of tumors. In addition, high FOXM1 co-expression was detected in G3 NECs. The markers showed significant correlation with each other and are associated with poor prognosis. Cytoplasmic Aurora Kinase B expression was detected exclusively in G1/G2 tumors, whereas nuclear expression was detected in G3 tumors. Aurora Kinase B is directly associated with the degree of differentiation, tumor progression, and aggressiveness of GEP-NEN disease, as well as with overexpression of other regulators of mitosis, including Survivin and FOXM1.

Conclusion

In this study the expression behavior of Aurora Kinase B and its co-regulators was investigated for the first time in GEP-NETs. Routine detection of these parameters as a set appears to be more biologically relevant than Ki-67 alone and may facilitate individualization of therapeutic strategies in GEP-NENs. A better description of heterogeneous G3 tumors as G3-NET and G3-NEC can thus be better defined as subgroups.

1. Einleitung

1.1 Gastroenteropankreatische Neuroendokrine Neoplasien

Die neuroendokrinen Zellen im Gastrointestinaltrakt bilden zusammen mit den endokrinen Zellen des Pankreas das gastroenteropankreatische (GEP-) System. Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien (GEP-NENs) stellen eine seltene und heterogene Tumorentität dar. Neuere Daten zeigen allerdings eine steigende Inzidenz. GEP-NENs weisen unterschiedliches Wachstumsverhalten und komplexe Krankheitsbilder auf, unterscheiden sich in der Funktionalität und im Somatostatinrezeptorbesatz. Aufgrund des breiten biologischen Spektrums und der Heterogenität bezüglich klinischer Ausprägung, Krankheitsverlauf und Prognose, stellen Diagnose und Behandlung eine große Herausforderung dar. Die chirurgische Totalresektion ist der einzige kurative Therapieansatz. Jedoch wird die Erkrankung aufgrund fehlender Symptome oftmals erst im späten Stadium diagnostiziert. Der Krankheitsverlauf bei GEP-NEN kann über Jahrzehnte andauern. In diesem Zeitraum bedarf die Therapie eines hohen Grads an Individualisierung zur Tumorlastkontrolle. Der Zeitpunkt, zu dem die Erkrankung einen raschen und aggressiven Verlauf annimmt, ist schwer vorhersehbar und der Auslöser in der Pathogenese noch unverstanden. Daraus resultieren für den klinischen Alltag offene Fragen, beispielsweise über die Abschätzung des Krankheitsverlaufs, der Prognose und der Vorhersehbarkeit des Therapieansprechens. Es fehlen prognostische und prädiktive Marker, die helfen, den Krankheitsverlauf besser einzuschätzen.

1.2 Epidemiologie

Die Inzidenz der gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumore beläuft sich in der Bundesrepublik Deutschland auf ca. 2,53 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner und Jahr (Scherübl et al. 2013). Neuroendokrine Tumoren wurden früher als selten angesehen. 0,46% aller malignen Erkrankungen gingen auf die neuroendokrinen Tumoren des bronchopulmonalen oder des gastrointestinalen Systems zurück (Modlin et al. 2003). Das Surveillance Epidemiology and End Results Program (SEER) des National Cancer Instituts (NCI) der USA stellte eine steigende Inzidenz der Erkrankung in der US-Bevölkerung in den letzten drei Jahrzehnten fest. Ähnliche Feststellung machten auch Arbeitsgruppen aus Deutschland und England (Scherübl et al. 2013 und

Ellis et al. 2010). Die erhöhte Inzidenz ist wahrscheinlich zurückzuführen auf den zunehmenden Erkenntnisgewinn über die Biologie dieser Tumorentität und sicherlich auch durch Zunahme der inzidentell gestellten Diagnosen aufgrund von Fortschritten der endoskopischen und radiologischen Diagnostik (Modlin et al. 2008). Trotz dieser Fortschritte sind die klinischen Ergebnisse bezüglich des besseren Überlebens weiterhin nicht zufriedenstellend. Die Behandlung stellt interdisziplinär eine Herausforderung dar und die Therapiemöglichkeiten sind nach wie vor begrenzt.

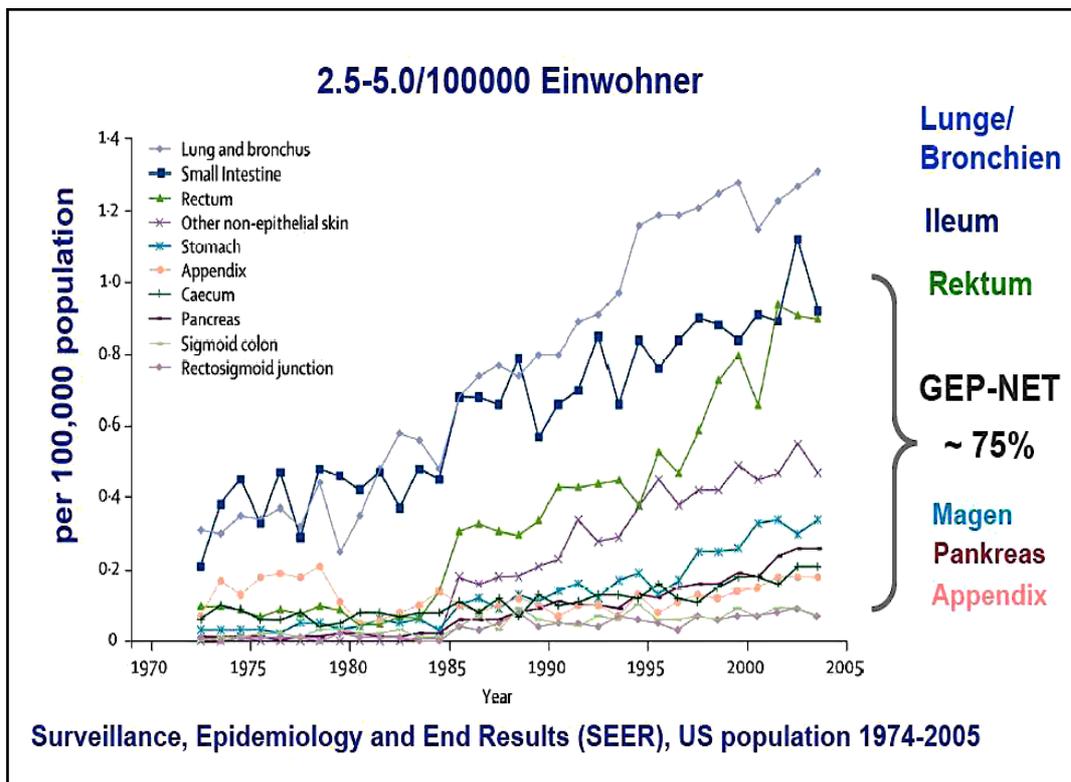


Diagramm 1: Steigende Inzidenz der GEP-NEN in der US-Bevölkerung (Modlin et al. 2008)

1.3 Nomenklatur und Klassifikation

1.3.1 Geschichte der Klassifikation

Neuroendokrine Tumore haben eine ungewöhnliche Biologie. Da neuroendokrine Zellen diffus im gesamten Magen- Darm- Trakt verteilt vorzufinden sind, beschränkt sich die Lokalisation der NETs nicht nur auf ein Organ. Mit 64,3% ist der Gastrointestinaltrakt der größte Manifestationsort, gefolgt von dem Bronchiopulmonalen System mit 27,9% (Safatle-Ribeiro et al. 2007). GEP-NETs wurden erstmals im Jahr 1907 von dem deutschen Pathologen Siegfried Oberndorfer beschrieben. Er etablierte mit dem Begriff „Karzinoid“ eine Tumorerkrankung, die im Gegensatz zu den „klassischen“ Karzinomen ein eher langsames Wachstum und weniger aggressives Verhalten aufweist (Modlin et al. 2008). 1930 prägte Feyrter die Bezeichnung „Helle Zellen“ (Klöppel 2003). Aufgrund ihrer Fähigkeit biogene Amine zu decarboxylieren, wurden sie von Pearse als APUD-Zellen (amine precursor uptake and decarboxylation) bezeichnet. Williams und Sandler versuchten 1964 die Heterogenität dieser Tumorerkrankung zu erfassen und unterteilten die „Karzinoide“ nach ihren embryonalgeschichtlichen Gesichtspunkten in Foregut (Lunge, Magen, Duodenum, oberes Jejunum und Pankreas), Midgut (unteres Jejunum, Ileum, Appendix, Dickdarm bis zum mittleren Colon transversum) und Hindgut (restliches Colon und Rektum). Die „Karzinoide“, übersetzt „karzinom- ähnlich“, sind biologisch jedoch alle potenziell maligne, wie wir heute wissen. Obwohl der Begriff des Karzinoids sich lange Zeit in der medizinischen Terminologie etabliert hat, kann er im klinischen Alltag die große biologische Vielfalt der Erkrankung nicht gerecht werden. Der Begriff wird heute nur noch für die typischen und atypischen NETs der Lunge verwendet. Bald erkannte man, dass die NENs nicht nur langsam wachsende Neoplasien umfassen, sondern auch schlecht differenzierte Karzinome mit hohem Grad an Malignität und ungünstiger Prognose (Übersicht bei Anlauf et al. 2011). Im Jahre 2000 wurden in Rahmen der neuen WHO-Fassung zum ersten Mal die Begriffe „neuroendokrine Tumore“ und „neuroendokrines Karzinom“ geprägt. Im Einzelnen wurden sie in gut differenzierte endokrine Tumore, gut differenzierte endokrine Karzinome und schlecht differenzierte endokrine Karzinome unterteilt. Entscheidende Kriterien waren Tumorgröße, Morphologie der Tumorzellen, Proliferationsindex Ki-67-Expression, Angioinvasion und die Lokalisation des Primärtumors.

1.3.2 Aktuelle Klassifikation

Die WHO-Klassifikation aus dem Jahr 2010 berücksichtigte weiterhin den Differenzierungsgrad und die Proliferationsrate. Neu ist, dass Eigenschaften wie Lokalisation, Tumorausdehnung und Angioinvasion in die TNM- Klassifikation verlagert wurden. Diese WHO-Klassifikation geht von der Annahme aus, dass alle NEN potenziell maligne sind und sich in der Wahrscheinlichkeit zur Metastasierung unterscheiden (Rindi 2010). Die Unterscheidung zwischen einem gut differenzierten neuroendokrinen Tumor und einem niedrigmalignen hoch differenzierten neuroendokrinen Karzinom wurde von der WHO aufgegeben. Beide Gruppen werden nun als G1 bzw. G2 NET bezeichnet. Alle schlecht differenzierten neuroendokrinen Neoplasien werden zu den NECs gezählt. Alle NEC-Tumore sind G3-Tumore. Gemischte adenoendokrine Karzinome wurden separat erwähnt. Die Klassifikation wurde im Jahr 2017 verfeinert: Für pankreatische G1- und G2-Tumore (PanNENs) wurde die cut-off-Grenze für Ki-67 auf $< 3\%$ angehoben. Es wurde außerdem die Gruppe der pankreatischen neuroendokrinen G3-Tumore eingeführt (Klöppel et al. 2017).

WHO 2000	WHO 2010 (gastroenteropankreatisch)	WHO 2017 (Pankreas)
Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor (NET)	NET G1, Ki-67 $\leq 2\%$	NET G1, Ki-67 $< 3\%$
Hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom (NEC)	NET G2, Ki-67 2-20%	NET G2, Ki-67 3-20%
Niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom (PDEC)	NEC G3, Ki-67 $> 20\%$ - kleinzellig - großzellig	NEC G3, Ki-67 $> 20\%$ gut differenziert - kleinzellig - großzellig
Gemischtes exokrines- endokrines Karzinom	Gemischtes adenoneuroendokrines Karzinom (MANEC)	Gemischte neuroendokrine/nicht neuroendokrine Neoplasie (MiNEN)

Tabelle 1: Klassifikationsschema der neuroendokrinen Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems gemäß WHO: 2000, 2010, 2017 im Vergleich. MANEC=*mixed adenoneuroendocrine carcinoma*, MiNEN=*mixed neuroendocrine-nonneuroendocrine neoplasm*

1.4 Diagnostik und Therapie

Krankheitsverlauf und Prognose sind sehr heterogen und können trotz gemeinsamer Abstammung aus dem neuroendokrinen Zellsystem unterschiedliche Verläufe annehmen. So liegt beispielsweise die 5-Jahres Überlebensrate der Insulinome bei 97%, bei nicht funktionellen und asymptomatischen Pankreas-NETs jedoch nur bei 30% (Oberg 2005). Die meisten GEP-NETs treten sporadisch auf. Gehäuftes Auftreten beobachtet man bei hereditären Syndromen wie MEN 1 oder das Wermer-Syndrom (MEN 1 Gen), von Hippel-Lindau Syndrom (VHL-Gen) oder Neurofibromatose 1 (NF-1 Gen-Mutation). Das klassische Karzinoid-Syndrom mit Flush, Diarrhoe und Gewichtsverlust beobachtet man nur bei ca. 5% der Patienten und ist oft mit dem Vorliegen von Lebermetastasen assoziiert (Aleksandraki et al. 2017). Die Leitsymptome sind dabei meist Folgen der exzessiven Freisetzung von Hormonen, die von dem Primärtumor oder dessen Metastasen gebildet werden. Es gibt aber auch Pankreas-NETs, die zwar Hormone bilden, klinisch aber asymptomatisch sind, da sie entweder keine Peptide freisetzen, oder die freigesetzten Produkte verursachen keine Beschwerden.

1.4.1 Diagnostik

Da alle NET-Zellen synaptische und neurosekretorische Vesikeln aufweisen, ist die Bestimmung der neurosekretorischen Marker Chromogranin A und Synaptophysin ein fester Bestandteil der Basisdiagnostik. Deren Bestimmung wird sowohl von der WHO als auch von ENET empfohlen. Ausnahme stellen die rektalen NETs, die trotz elektronenmikroskopisch nachweisbarer großer Vesikeln kein Chromogranin A exprimieren (Anlauf et al. 2011). Weitere diagnostische Schritte werden orientierend am klinischen Bild der Erkrankung eingeleitet.

Laboruntersuchungen: Die allgemeine Labordiagnostik richtet sich bei funktionell aktiven NETs nach dem jeweils sezernierten Hormon/Peptid. Chromogranin A ist zwar sehr sensitiv, aber eignet sich nicht als spezifischen Marker im Rahmen der Diagnostik. Die Serumkonzentration kann zudem, wie beispielsweise im Rahmen einer Niereninsuffizienz, falsch positiv erhöht sei. Chromogranin A wird meist für den intraindividuellen Verlauf bestimmt. Da die Serumkonzentration mit der Tumorgröße korreliert, eignet es sich als Prognosemarker (Schott und Oberg 2011). Inzwischen gibt es auch zunehmend vielversprechende Ansätze in Multiplex Assays aus Blutproben,

wie beispielsweise der NETest®, wenn gleich auch nicht klinisch verfügbar. Im Vergleich zu Chromogranin A zeigen sie eine höhere Sensitivität und Spezifität (Modlin et al. 2015).

Bildgebung: Früher galt: In 20%-50% der Fälle bleibt der Primärtumor unentdeckt. Zur Detektion von Insulinomen >1cm eignet sich die Endosonografie. Deren Sensitivität bei duodenalen NETs liegen bei 45-60%, bei Pankreas NETs bei 90-100%. Lebermetastasen werden im CT mit einer Sensitivität von 79% detektiert, im MRT 95% (Schott and Oberg 2011). Lange Zeit galt der „Octreoscan“ als Goldstandard in der nuklearmedizinischen Diagnostik. Hierbei wird Octreotidacetat als Somatostatinanalogon mit ¹¹¹Indium zur Detektion von Somatostatinrezeptoren der neuroendokrinen Tumore markiert. Eine höhere Sensitivität und Spezifität für die meisten G1- und G2-Tumore zeigt das 68-Gallium-basierende Somatostatinrezeptor-Positronen-Emissionsverfahren. G3-Tumore mit einem deutlich höheren Glukoseumsatz können im F18-FDG-PET-CT nachgewiesen werden.

Histologie: Von Bedeutung für Diagnostik und Therapie ist die membranöse Expression von Somatostatinrezeptoren (SSTR). In über 90% der Fälle korreliert die immunohistochemische Expression der SSTR2A mit der Ansprechbarkeit auf die Behandlung mit Somatostatinanaloga bzw. auf die Peptidrezeptor-Radio-Therapie (Miederer et al. 2009) und der Darstellbarkeit im 68-Gallium-DOTATOC-PET-CT. Die Proliferationsrate des Tumors wird immunohistochemisch durch eine Ki-67/MiB-1 Färbung des Biopsats oder OP-Präparats bestimmt. Hieraus leitet sich auch die Grading-Einteilung in G1-, G2- und G3-Tumore.

1.4.2 Therapie

Chirurgie: Die Indikation zur Operation ist u.a. abhängig vom klinischen Beschwerdebild, der Tumorgroße, Lokalisation, Malignitätsgrad und Metastasierungspotenzial. Magen-NETs, die kleiner als 2cm sind, keine Angioinvasion aufweisen und auf Mukosa und Submukosa beschränkt sind, können endoskopisch abgetragen werden. Bei größeren Tumoren erfolgt gewöhnlich eine subtotale Magenresektion oder eine Gastrektomie. Bei Dünn- und Dickdarm NETs wird der betroffene Darmabschnitt zusammen mit den ableitenden Lymphwegen reseziert. Bei Pankreas-NETs wird eine organerhaltende Resektion angestrebt. Metastasen, sofern möglich, werden ebenfalls mit dem Ziel einer R0-Resektion angegangen. Bei der Leber

ist vor einer Resektion eine portale Embolisation möglich. Beim MEN 1 Syndrom wird die Indikation zur chirurgischen Therapie individuell gestellt, da die Tumore multipel auftreten, früh lymphogen metastasieren und eine hohe Rezidivrate aufweisen. Aufgrund der Schwierigkeit zur Beurteilung des Resektionsausmaßes bei diffuser Verteilung der neoplastischen Zellen wird das Insulinom selten chirurgisch behandelt.

Chemotherapie und Radioablation: Transarterielle Chemoembolisation (TACE) der Leber ist eine palliative Therapiemöglichkeit bei Patienten mit disseminierten Lebermetastasen. Hierfür eignen sich als Standard-Chemotherapeutikum Doxorubicin. Radiofrequenz-induzierte Thermoablation (RFA) ist ebenfalls eine palliative Maßnahme und wird oft in Kombination mit einer Leberresektion angewandt. Für schlecht differenzierte G3-Tumore wird die Behandlung mit Chemotherapeutika empfohlen. Für Cisplatin in Kombination mit Etoposid wird eine Ansprechbarkeit von 40%-70% angegeben. Zwar ist die initiale Ansprechbarkeit gut, jedoch beobachtet man im Verlauf häufig Rezidive. Für NECs mit einer Proliferationsrate von >20% ist eine Polychemotherapie mit Streptozocin, 5-FU und/oder Doxorubicin indiziert. Für Dünndarm-NETs wird die Chemotherapie aufgrund schlechter Ansprechrate nicht empfohlen.

Somatostatin-Analoga: Goldstandard für die Behandlung von funktionell aktiven und inaktiven GEP-NENs ist die monatliche Injektion mit Somatostatin-Analoga. Der PROMID-Studiengruppe gelang den Nachweis der antiproliferativen Wirkung des Somatostatin-Analogons Octreotid (Sandostatin®) mit einem Überlebensintervall von 14,3 Monaten vs. 6 Monaten mit Placebo (Rinke et al. 2009). Die Therapie mit Sandostatin war initial zunächst nur für die Behandlung von funktionellen GEP-NETs zur Symptomkontrolle zugelassen und wurde dann aufgrund der Ergebnisse aus der PROMID-Gruppe auch für funktionell inaktive NETs zugelassen. Für Midgut-NETs und bei Patienten mit einem unklarem Tumorverhalten stellt Octreotid die Firstline-Therapie dar (Pavel et al. 2016). Lanreotid wird aufgrund der Ergebnisse der CLARINET-Studie (Caplin et al. 2014) als Firstline-Therapie bei Pankreas-NETs empfohlen (Pavel et al. 2016). Das Nachfolgepräparat SOM230 (Pasireotid) bindet neben SSTR-Typ 2 auch andere Rezeptorsubtypen (1, 3, und 5), hat aber klinisch keinen Routine-Einsatz bei NET.

Weitere medikamentöse Therapie: Als Secondline-Therapie für funktionell aktive GEP-NETs, welche zusätzlich zum Somatostatin-Analogen verabreicht wird, kann Interferon- α oder Telotristat, ein Hemmer der Serotonin-Synthese, eingesetzt werden.

Neue zielgerichtete Medikamentenansätze, wie beispielsweise der mTor-Inhibitor Everolimus ist für progrediente nicht-pankreatische, Midgut- und Lungen-NETs zugelassen. Für fortgeschrittene Pankreas-NETs ist der Multikinase-Inhibitor Sunitinib zugelassen (Übersicht bei Pavel et al. 2016).

Peptid-Radiorezeptortherapie (PRRT): Tumore, die eine hohe Somatostatinrezeptor Expression aufweisen, sprechen gut auf eine Peptidrezeptor vermittelte Radionuklidtherapie (PRRT) an. Aufgrund hoher Octreotid-Aufnahmefähigkeit des Tumors wird über einen DOTA-Chelator das mit einem Nuklid beladene Somatostatinanalogon gebunden. Meist werden Betastrahler wie ⁹⁰Yttrium oder ¹⁷⁷Lutetium verwendet. Am besten sprechen pankreatische NETs und Midgut-NETs auf PRRT an. Tumorprogress unter PRRT ist mit einer schlechten Prognose verbunden.

1.5 Prädiktive Biomarker

Mit einem Biomarker sollte ein biologischer Zustand oder ein Krankheitsverlauf möglichst zuverlässig und objektiv messbar sein. Ein prädiktiver Biomarker sollte idealerweise das Tumorverhalten und die Therapieansprechbarkeit richtungsgebend „voraussagen“. Wenn die Diagnose ohne Nachweis einer Metastasierung gestellt ist, beträgt die 10 Jahre-Überlebensrate > 90%, nach Metastasierung nur noch 50%. Abhängig von der Proliferationsrate/der WHO-Einteilung beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate bei höhergradigen NECs maximal 20% (Pape et al. 2008). Der Mechanismus, dem die verschiedenen Differenzierungsgrade der GEP-NET zugrunde liegen, ist bisher noch nicht bekannt. Ungefähr die Hälfte aller Neuroendokrinen Tumore machen durch die exzessive Ausschüttung bioaktiver Peptide oder Amine auf sich aufmerksam (Serotonin, Somatostatin, Histamine, Insulin, Gastrin). Die Peptide sind in den sogenannten large dense-core Vesikeln und small synaptic-like Vesikeln gespeichert. Bestandteile dieser Vesikel wie z.B. Chromogranin A und Synaptophysin dienen als Marker der Neuroendokrinen Tumore. Chromogranin A wird in ca. 80-90% der Fälle von GEP-NENs exprimiert (Lindholm et al. 2012). Um histologisch die Diagnose GEP-NEN stellen zu können, ist der immunhistochemische Nachweis von Synaptophysin und/oder Chromomogranin A obligatorisch (Kloppel et al. 2009).

1.5.1. Ki-67 (MIB-1)

Erstmalig wurde das Ki-67-Antigen 1984 von Gerdes beschrieben (Gerdes et al. 1984). Dessen immunhistochemische Darstellung ist mittlerweile fester Bestandteil in der histopathologischen Routinediagnostik. Ki-67 wird bei gesunden Zellen und Tumorzellen von am Zellzyklus teilnehmenden Zellen exprimiert. Ruhende Zellen in der G0-Phase exprimieren kein Ki-67. Der prozentuale Anteil an Ki-67-positive Zellkerne gibt somit die Proliferationsrate, also die Wachstumsfraktion des Tumors an. Für die klinische Routinediagnostik hat sich der Antikörper MIB-1 bewährt (Gerdes et al. 1992). Dieser ist paraffingängig und eignet sich daher für retrospektive Untersuchungen von Tumorgewebe. Die prognostische Bedeutung von Ki-67 wurde bereits mehrfach belegt (Uppin et al. 2017, Rindi et al. 2012). In der klinischen Erfahrung ist die prognostische Aussagekraft von Ki-67 jedoch für die G2-, wie auch die G3- Tumorgruppe beim GEP-NEN mit Einschränkung zu interpretieren. Die Wachstumsfraktion spiegelt nicht in jedem Fall den tatsächlichen klinischen Verlauf wieder.

1.6 Mitose-assoziierte Kinasen

Proteine, die anti-apoptotische Signalwege regulieren, können potenzielle „Targets“ in der medikamentösen Tumorthherapie sein. Der sogenannte Chromosomal-Passenger-Complex, bestehend aus Aurora Kinase B, INCENP, Borealin und Survivin, ist ein wichtiger Komplex in der Zytokinese. Während des Zellzyklus ist dieser Komplex an der Ausbildung der zentralen Mikrotubuli beteiligt (Carmena and Earnshaw 2003).

1.6.1 Aurora Kinase B

Im Mittelpunkt des Interesses steht in dieser Arbeit das Expressionsverhalten von Aurora Kinase B bei GEP-NEN. Sie reguliert die Chromosomensegregation während der Zellteilung und ist an Mikrotubulli in der Nähe von Kinetochoren lokalisiert. Fehler in diesem Prozess verursachen genetische Instabilität. Die Familie der Aurora Kinasen umfasst insgesamt drei Mitglieder: Aurora Kinase A, B und C und wurden 1995 erstmalig beschrieben (Glover et al. 1995). Das Aurora Kinase B- Gen (*AURK B*) ist auf Chromosomen 17 q13 lokalisiert. Aberrationen dieser Signalwege verursachen

mitotische Fehler und fördern somit die Tumorentstehung (Dar et al. 2010). Aurora Kinase B funktioniert zusammen mit den Bindungsproteinen INCENP, Survivin und Borealin. Zahlreiche Untersuchungen belegen eine Überexpression der Aurora Kinasen in hämatologischen Malignomen (Sherif et al. 2011) und soliden Tumoren (Qi et al. 2007, Lee et al. 2006, Tuncel et al. 2012). So wurde Aurora Kinase B in den letzten Jahren zunehmend als ein potenzieller Angriffspunkt bei der Krebstherapie diskutiert. Die Überexpression korreliert beispielsweise beim Prostatakarzinom mit dem klinischen Stadium (Chieffi et al. 2006). Auch bei hämatologischen Malignitäten wird Aurora Kinase B überexprimiert (Moore et al. 2010). Das Überexpressionsverhalten von Aurora Kinasen bei Malignomen macht sie als potenziellen Angriffspunkt in der Tumorthherapie interessant. Interessanterweise ist die Aurora B- Aktivität bzw. deren Expressionslevel in der G2/M-Phase am höchsten (Katayama and Sen 2010). Die Hypothese ist daher ein Nutzen des zusätzlichen Gebrauchs von Aurora B-Inhibitoren neben der Gabe von Chemotherapie. Das Expressionsverhalten von Aurora Kinase B beim GEP-NET ist weitestgehend unerforscht und ist daher Gegenstand dieser Arbeit.

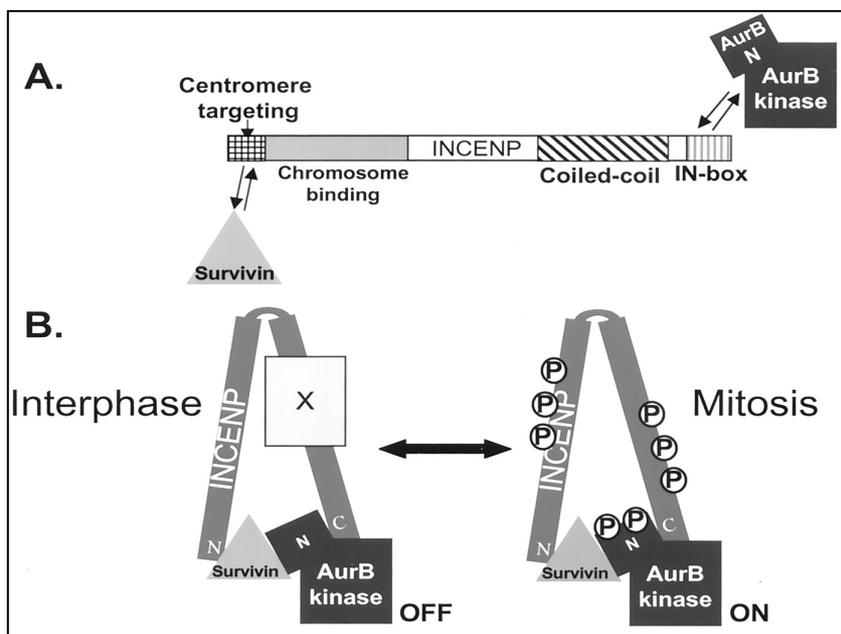


Abbildung 1: Modell der Interaktion zwischen Aurora B, INCENP und Survivin: A) Survivin bindet das N-Terminus des INCENPs, N-Terminus von Aurora B bindet das C-Terminus des INCENPs. B) Komplex in der Interphase im hypophosphorylierten Zustand. Die Phosphorylisierung der drei Proteine während der Mitose führt zu einer erhöhten Kinase-Aktivität. Modifiziert nach Bolton et al. 2002.

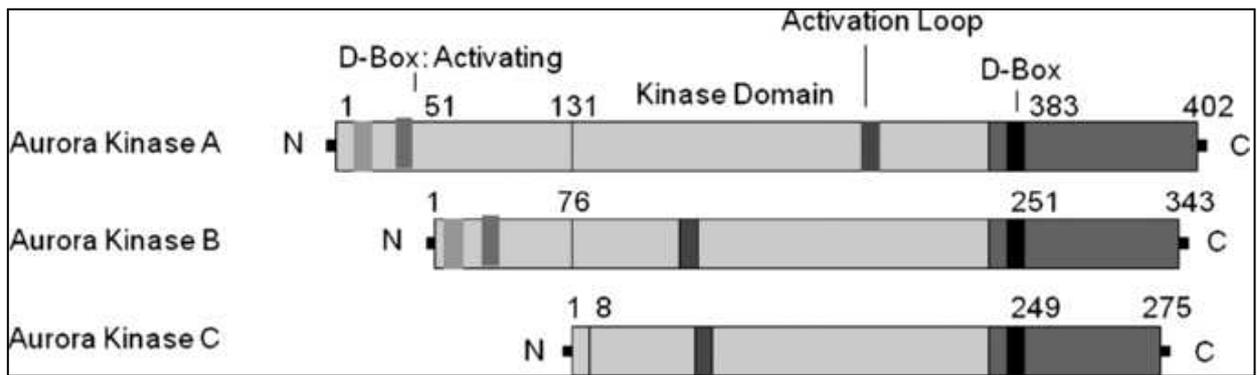


Abbildung 2: Schematischer Aufbau von Aurora A, B, and C Kinasen (modifiziert nach Dar et al. 2010). Humane Aurora Kinasen haben eine variable Größe von 309-403 Aminosäuren und weisen drei Domänen auf: die N-terminale Region, die kurze C-terminale Region und die Zentralkomäne mit der katalytischen Region.

1.6.2 Survivin

Das Survivin-Protein ist ein Mitglied der IAP- (Inhibitor of apoptosis) Familie, welches 1997 von Ambrosini *et al.* identifiziert und charakterisiert wurde (Ambrosini, Adida, and Altieri 1997). Es handelt sich hierbei um ein 16,5 kD Protein bestehend aus 142 Aminosäuren. Als ein weiteres Chromosomal Passenger Protein ist es bifunktional: Ihm wird eine anti-apoptotische und eine Mitose-fördernde Funktion zugeschrieben. Survivin bildet mit Borealin, INCENP und Aurora Kinase B den Chromosomal Passenger Complex. Interessanterweise wird SURVIVIN wenig in nicht differenzierten Zellen bzw. im Normalgewebe exprimiert. Dagegen lassen sich hohe Expressionen in sich rasch teilenden und regenerierenden Geweben wie Leberparenchym, gastrointestinaler Mukosa und ovariellen Granulazellen nachweisen. Survivin wird von den meisten soliden Tumoren oder hämatologischen Malignomen stark exprimiert (Pennati, Folini, and Zaffaroni 2007). Auch zeigen diverse Untersuchungen eine Überexpression in präkanzerogenen Vorstufen wie beispielsweise in Kolonpolypen, Brustadenomen und beim Morbus Bowen. Dies deutet darauf hin, dass Survivin bereits schon zu einer sehr früheren Phase während einer malignen Transformation aberrant reguliert wird. Die bisher gewonnenen Erkenntnisse machen Survivin zu einem interessanten und vielversprechenden Angriffsziel in der Krebstherapie. Neben dem zytoplasmatischen und nukleären Pool, beschreiben weitere Untersuchungen auch die Existenz von einem mitochondrialen Survivin-Pool (Dohi et al. 2004). Bei antiproliferativen Stimuli wird aus diesem Pool Survivin ins Zytosol ausgeschüttet. Dies hat eine Hemmung des

Caspaseaktivität zur Folge. Die Apoptose wird so inhibiert. Weitere Untersuchungen zeigen einen Zusammenhang zwischen Überexpression und Resistenzbildung neoplastischer Zellen gegenüber Strahlen- und Chemotherapien (Pennati, Folini, and Zaffaroni 2007). Shi et al. zeigten bei Patienten mit einem nasopharyngealen Karzinom, dass der Survivin-Inhibitor YM-155 *in vivo* Tumorwachstum in Dosisabhängigkeit hemmt (Shi et al. 2020). Wang et al zeigten, dass eine Inhibition der Survivin-Expression Tumorzellen erneut sensibilisieren kann (Wang, Zhang, and Feng 2003). Interessanterweise zeigte eine Studie unserer Arbeitsgruppe, dass für die G2-NENs Survivin eine bessere Aussagekraft hinsichtlich Prognose aufzeigt, als Ki-67 allein (Ki-67 >5%, aber Survivin negativ, klinisch mit guter Prognose). Die Überexpression von Ki-67 ist wohl darauf zurückzuführen, dass Ki-67 in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert wird, Survivin dagegen nur in der G2/M-Phase (Grabowski et al. 2005). Für den Kliniker könnte dies bedeuten, dass für die G2- Tumorguppe, Survivin zur Prognose-Einschätzung besser geeignet erscheint, als Ki-67 allein.

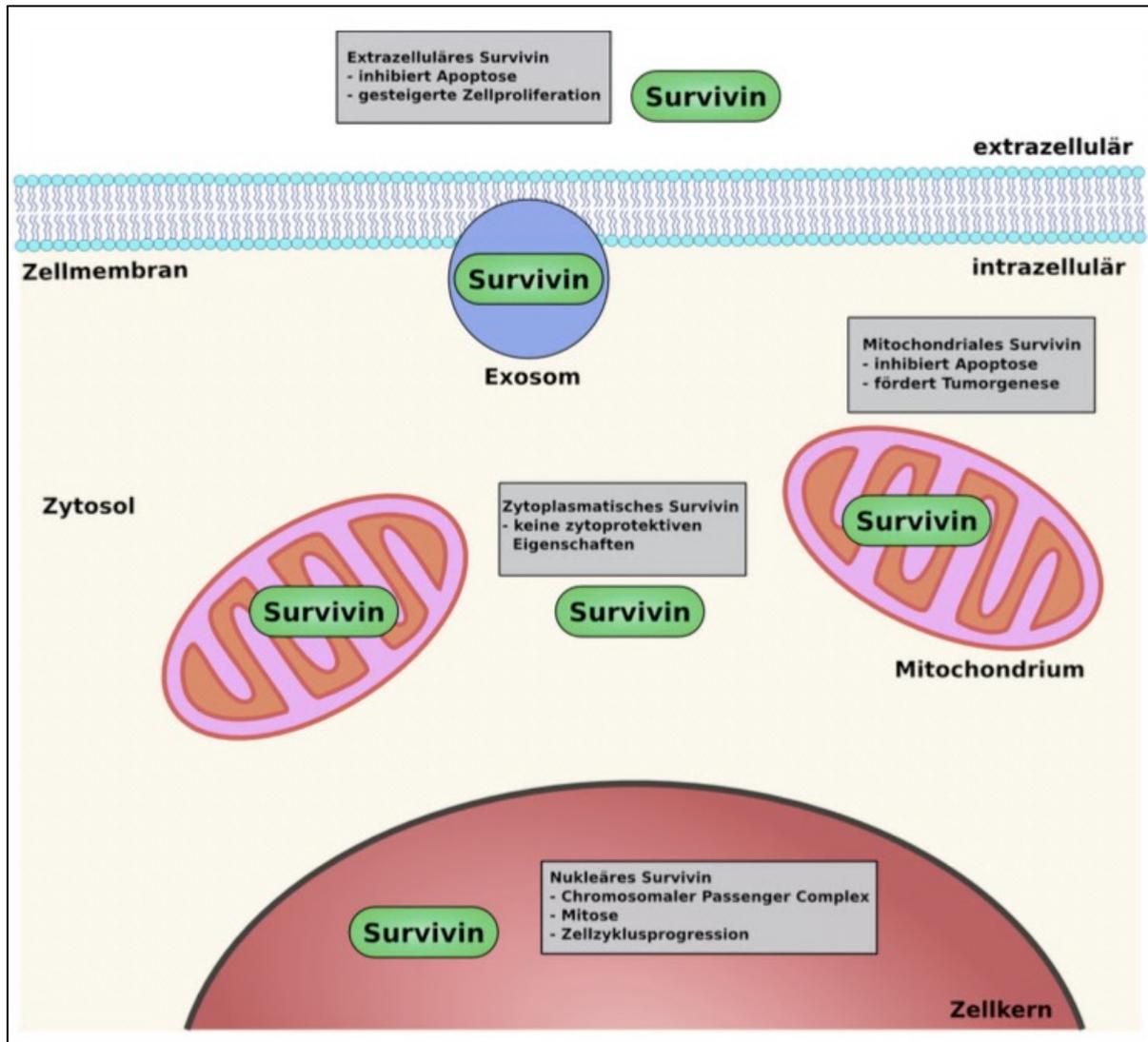


Abbildung 3: Intra- und extrazelluläre Lokalisation von Survivin und seine Funktionen. Survivin inhiert extrazellulär Apoptose und führt zu Tumorzellproliferation. Intrazellulär existieren 3 Lokalisationen: der nukleäre, zytoplasmatische und mitochondriale Pool (Wiedemuth 2012, modifiziert nach Dallaglio et al. 2012)

1.7 Faktoren des Signalweges

1.7.1 Insulin-like Growth Factor-1 Rezeptor (IGF-1R)

Der IGF-1 Rezeptor wurde schon seit mindestens 2 Jahrzehnten als ein vielversprechender Angriffspunkt in der Tumorthherapie diskutiert. Es handelt sich um ein Peptid aus 70 Aminosäuren. Es bindet an Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität. Durch die Bindung an IGF-1R stimuliert es die Zellzyklus-Progression. IGF-1R besteht aus alpha- und beta-Untereinheiten. Die alpha-Einheit befindet sich extrazellulär und die beta-Einheit intramembranär und ist Träger der

Tyrosinkinase-Aktivität. Die Phosphorylierung von IGF-1R an dessen beta-Untereinheit führt über die Aktivierung von PI3K/Akt und MAPK zu einer Transkription und Translation von Survivin (Yan et al. 2017). Die Aktivierung von IGF-1R verhindert über die Aktivierung von ras-, raf- und MAP-Signalwegen den Übergang der Zelle in die Apoptose (Lloret et al. 2007). In der Kolonschleimhaut wurde die Überexpression von IGF-1R bei der Transition von Adenom zum Karzinom beschrieben (Peters et al. 2003). Eine Erniedrigung der zirkulierenden IGF-1-Konzentration reduziert die Inzidenz von Lebermetastasierung bei Mäusen (Wu et al. 2002). Beim Mensch wird eine erhöhte IGF-1-Konzentration wie beispielsweise bei der Akromegalie-Erkrankung möglicherweise mit erhöhter Inzidenz für kolorektales Karzinom (Yamamoto et al. 2015) bzw. für präkanzerogene Schleimhautveränderungen (Wang et al. 2017) in Zusammenhang gebracht.

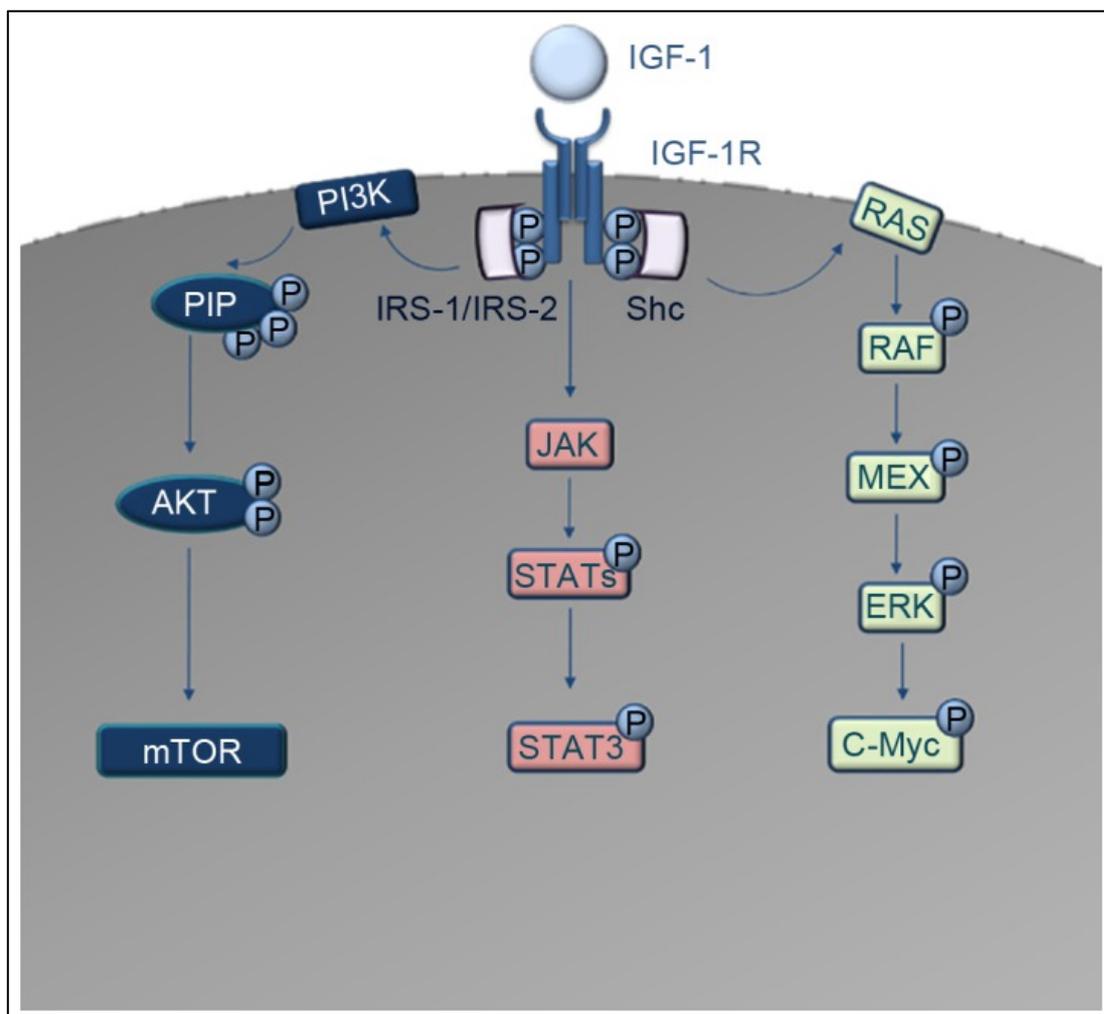


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aktivierung und Regulation von IGF-1R (Youness et al. 2016)

1.7.2 Forkhead Box M1 (FOX M1)

In dieser Arbeit ist auch das Forkheadbox-Protein FOXM1 von Interesse. Es handelt sich um einen Transkriptionsfaktor und einen übergeordneten Regulator von Survivin und Aurora Kinase B. FOXM1 wurde ebenfalls eine Rolle in der Tumorentstehung und Tumorprogression zugesprochen (Wierstra and Alves 2007). Dabei scheint es bei diversen malignen Tumorentitäten wie z.B. beim hepatozellulären Karzinom (Kalinichenko et al. 2004), Zervixkarzinom (Chan et al. 2008), Lungenkarzinom (Kim et al. 2006) überexprimiert zu sein. Xu *et. al* beschrieben die Rolle von FOXM1 bei der Resistenzbildung gegenüber der Chemotherapie bei NSCLC (Xu et al. 2012). In einer Arbeit von Lee *at al.* wurde die Rolle von FOXM1 in der Radioresistenz beim Glioblastom beschrieben (Lee et al. 2015). Dessen Bedeutung in GEP-NENs ist noch weitgehend unbekannt. Das Expressionsverhalten von FOXM1 bei GEP-NENs, sowie dessen Assoziation mit Aurora Kinase B sind Bestandteile der vorliegenden Arbeit.

1.7.3 Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)

Zusätzlich interessiert sich diese Arbeit für den Expressionsstatus von STAT3 bei GEP-NENs. STAT3 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression Zellzyklus-relevanter Gene reguliert und somit das Zellüberleben beeinflusst. Nach Aktivierung durch Phosphorylierung wandert es als Homodimer zum Zellkern, bindet an die DNA und aktiviert die Translation von Genen, die Antiapoptose und Angiogenese bewirken. In gesunden Zellen ist STAT3 nur passager aktiv. In Tumorzellen liegt STAT3 in der aktivierten Form (pSTAT3) vor (Furtek et al. 2016). Dessen Rolle in der Tumorprogression führte zu Bemühungen, vorgeschaltete Strukturen zu detektieren, um durch deren pharmakologische Beeinflussung STAT3 zu deaktivieren. FOXM1 wird als Transkriptionsfaktor des STAT3 beschrieben (Mencalha et al. 2012). Die Arbeit von Aleskandarandy et al. zeigte, dass der Nachweis von phospho-STAT3 im Kern prognostisch einen günstigen Faktor beim Mammakarzinom darstellt (Aleskandarany et al. 2016). In einer anderen Arbeit über NSCLC dagegen wurde jedoch eine schlechte Prognose im Zusammenhang mit Überexpression von STAT3 und pSTAT3 gesehen (Xu et al. 2014). Wie verhält es sich beim GEP-NET?

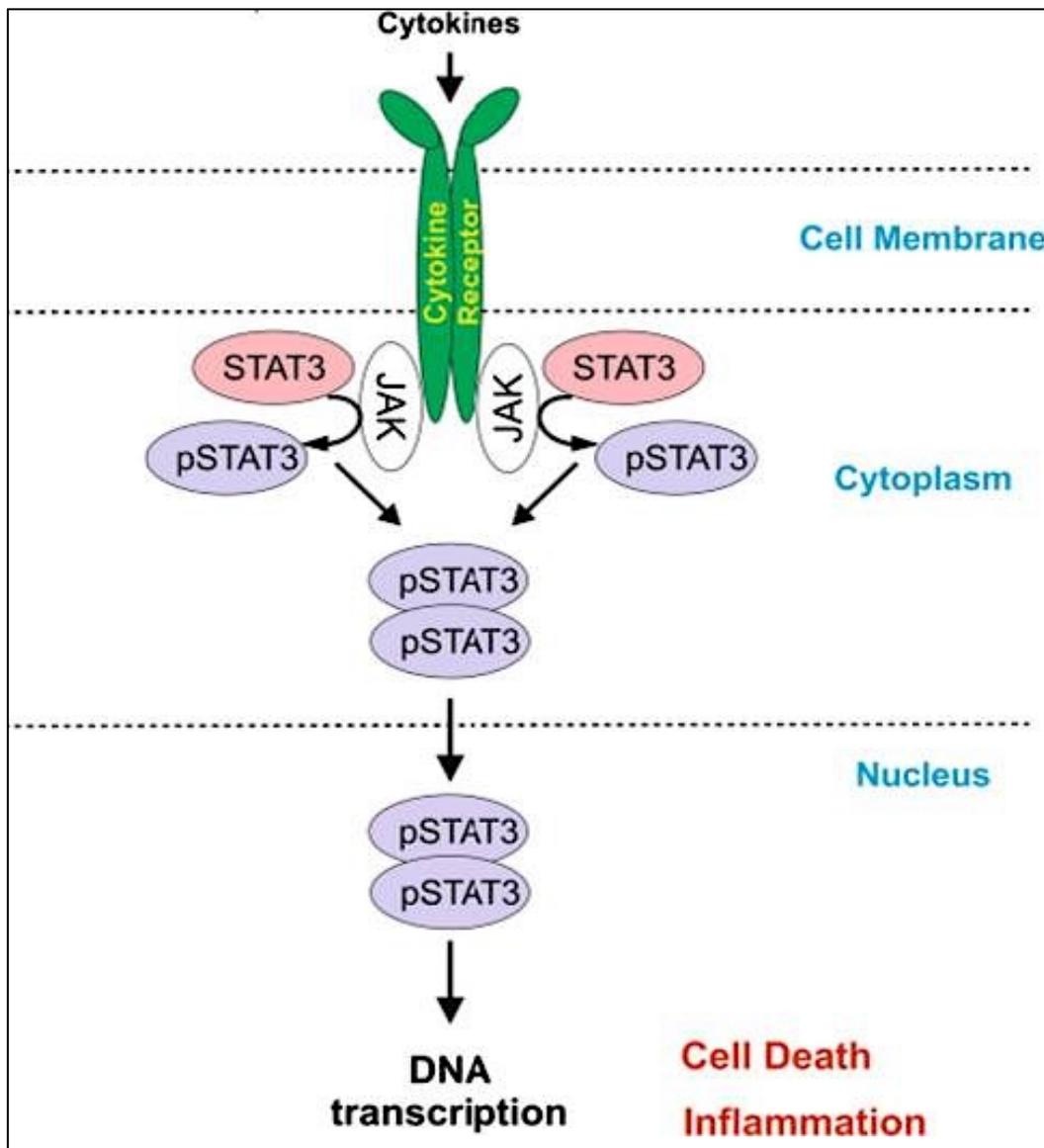


Abbildung 5: Signalkaskade der STAT3-Aktivität. Das durch Phosphorylierung aktivierte STAT3 (pSTAT) transloziert aus dem Zytoplasma in den Kern, bindet dort DNA und coaktiviert bzw. induziert Gentranskription, modifiziert nach Hristova et al. 2016

2. Fragestellung und Zielsetzung

Das Wachstumsverhalten und der Krankheitsverlauf neuroendokriner Tumore unterscheiden sich deutlich von den anderen Tumorentitäten im Gastrointestinaltrakt. Von großer klinischer und therapeutischer Relevanz wäre die Verfügbarkeit von prädiktiven Biomarkern, die das zu erwartende biologische Verhalten vorhersagen.

Diese Arbeit untersucht mittels Immunhistochemie das Expressionsverhalten Mitose-relevanter Proteine und ihrer assoziierten Signalproteine bei neuroendokrinen Neoplasien und beurteilt deren Korrelation mit klinisch-pathologischen Charakteristika. Ziel ist es, den prognostischen und den möglichen therapeutischen Stellenwert dieser Proteine bei GEP-NEN zu evaluieren. Nach der obigen Darstellung der aktuell noch offenen Fragestellungen in der Behandlung von GEP-NENs, sind die Zielsetzungen dieser Arbeit folgenderweise formuliert:

- 1) Welche Unterschiede in der Expression der o.g. Proteine gibt es innerhalb der biologischen Variationsbreite beim GEP-NEN?
- 2) Welche prognostische Bedeutung resultiert sich aus den Ergebnissen?
- 3) Welche Zusammenhänge zwischen den Proteinen ergeben sich hinsichtlich einer besseren Subklassifikation der heterogenen Variationsbreite der GEP-NET?
- 4) Welche Erkenntnisse resultieren daraus für die klinische Handhabung und für neue innovative Ansätze in Diagnostik und Therapie?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patientenkollektiv

Die immunhistochemische Untersuchung wurde an Tumorgeweben mit histologisch gesicherten GEP-NEN retrospektiv durchgeführt. Es wurden Patienten, die zwischen 1982-2006 in der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, am Universitätsklinikum der Philipps-Universität Marburg und am Universitätsklinikum Freiburg in Behandlung waren, einbezogen. Das positive Votum der Ethikkommissionen (EA1/321/16) lag vor.

Das Hauptpatientengut wurde mithilfe des Registers des Instituts für Pathologie der Charité Campus Benjamin Franklin zusammengestellt. Aus den Krankenakten wurden allgemeine Patienteninformationen, klinisch-pathologische Daten, wie Tumorlokalisierung, Grading, Differenzierungsgrad, Therapiedaten, sowie Follow-up Daten entnommen. Alte TNM-Stadien und WHO-Einteilungen wurden den Kriterien der aktuellen Klassifikation angepasst und aktualisiert. Befunde mit fehlender Klassifikationsangabe wurden entsprechend den vorhandenen histopathologischen Daten im Zusammenschau mit dem klinischen Verlauf gemäß der aktuellen Klassifikation eingeteilt. Ki-67 wurde -wenn in histologischen Befunden fehlend-nachgefärbt. Fälle, bei denen eine Datenvervollständigung nicht möglich war, wurden ausgeschlossen. In der Spezialsprechstunde für NET-Tumorerkrankungen der Poliklinik der Universitätsklinik Charité Benjamin Franklin wurden Informationen zum klinischen Verlauf gesammelt. Relevante Verlaufsinformationen über Tumorprogression, Rezidivfälle, sowie Sterbedatum und Todesursache wurden erhoben. Die Daten wurden diesbezüglich auch durch Befragen der Hausärzte mittels Fragebogen und auch durch Auskunft des Landeseinwohneramtes ergänzt. Auf diese Weise wurde ein follow-up von mindestens fünf Jahren bzw. bis zum Tod des Patienten erhoben. Patienten mit einem prognostisch relevanten Zweitmalignom wurden aus dem Kollektiv ausgeschlossen. Ein weiteres Ausschlusskriterium war Tod als Folge (peri-) operativer Komplikationen. Klinische Verlaufsinformationen externer Patienten wurden aus dem Universitätsklinikum der Philipps-Universität Marburg und Freiburg zur Verfügung gestellt. Auch hier wurden Fälle, bei denen notwendige Daten nur unvollständig erhoben werden konnten, ausgeschlossen. Es wurden nur Patienten berücksichtigt, bei denen die

klinisch-pathologischen Daten und Follow-up Informationen vollständig vorhanden waren oder rekonstruiert werden konnten. Insgesamt wurden 75 Patienten für die vorliegende Arbeit eingeschlossen.

3.1.2 Klinisch-pathologische Daten

Die folgende Übersicht zeigt die Verteilung der Tumorlokalisation in den jeweiligen Grading-Gruppen. Die Gruppe der G1-Tumore umfasst 43 Patienten, G2-Tumore 23 Patienten und G3-Tumore 9 Patienten. 38/75 Tumore waren zum Zeitpunkt der Diagnose bereits metastasiert. In die statistische Auswertung wurde, soweit vorhanden, stets der Primärtumor einbezogen. Sollten Gewebematerialien des Primarius und der Metastase vorhanden sein, wurde - um die statistische Auswertung nicht zu verfälschen - nur der Primärtumor eingeschlossen. In Fällen, bei denen kein oder nicht ausreichendes Gewebe des Primärtumors zur Verfügung stand, wurde die Metastase zur statistischen Auswertung herangezogen. Um die Heterogenität der G3-Tumore zu untersuchen, wurde diese Gruppe zusätzlich in NET G3 und NEC G3 bei einem Ki-67 cut-off Wert von 55% unterteilt. Diese Einteilung wurde auf der Grundlage der NORDIC-NEC-Studie (Sorbye et al. 2013) vorgenommen, um die Tumorbiologie besser zu erfassen, wohlwissend, dass es sich hier zum Zeitpunkt der Datenerhebung um eine noch nicht offizielle, abgesicherte Einteilung handelt.

	G1 Ki-67<2%	G2 Ki-67 =3-20%	G3 NET Ki-67 >20-55%	G3 NEC Ki-67 >55%	Gesamt
Lokalisation					
Magen	2	2	0	1	5
Pankreas	7	7	0	0	14
Dünndarm	25	12	1	0	38
Appendix	6	0	0	0	6
Dickdarm	3	2	1	6	12
Gesamtsumme	43	23	2	7	75
Metastasen-Status					
M0	23	7	1	0	31
M1	16	14	1	7	38
MX	4	2	0	0	6
Gesamtsumme	43	23	2	7	75
Gewebetyp					
Primärtumor	38	18	2	7	65
Metastase	5	5	0	0	10
Gesamtsumme	43	23	2	7	75
Tumorgröße					
<2 cm	22	8	0	0	30
>2 cm	8	8	2	6	24
n.a.	13	7	0	1	21
Gesamtsumme	43	23	2	7	75
Funktionalität					
aktiv	13	10	0	0	23
inaktiv	18	8	2	6	34
n.a.	12	5	0	1	18
Gesamtsumme	43	23	2	7	75

Tabelle 2: Übersicht über Lokalisation, Metastasen-Status, Gewebetyp, Tumorgröße, Funktionalität der G1-, G2- und G3-Tumore.

3.1.3 Chemikalien und Geräte

Reagenzien

Xylol

Ethanol

EDTA-Puffer (1mM)

Citrat-Puffer (pH6): 2,1

3% H₂O₂

Tris-gepufferte NaCl-Lösung (TBS, 0,05M, pH 7,4 bis 7,6)

DAB-Substratlösung (Sigma D 4413)

Zitratpuffer (pH 6): 2,1g Zitronensäure-Monohydrat (Merck 5949) in 1 L Aqua bidestilata

Hämatoxylin (Merck 4305)

Kaisers Glycerin-Gelatine (Merck 9242)

Materialien

Objektträger (DAKO ChemMate™, Capillary Gap Microscope Slides 75µm, Code No. S 2024)

Mikroskop

Olympus BH2

3.1.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Puffer	Methode
Polyklonaler Survivin-Rattenantikörper	(NOVUS Biologicals Inc, Littleton, CO, USA)	1:4000	EDTA	ABC
Monoklonaler Ki67-Antikörper (Klon MIB-1)	(DAKO Hamburg, Deutschland, Code No. N1633)	1:200	Citrat	APAAP
Aurora Kinase B (AIM-1)	BD Transduction Laboratories, San Jose, USA, 611082	1:50	Citrat	ABC
IGF-1R	Santa Cruz inc	1:100	Citrat	ABC
STAT3 phospho-(Tyr750)-STAT3	BD biosciences Cell Signaling Technology	1:100 1:50	Citrat	APAAP
FOXM1	Sc-502, Santa Cruz Inc., Dallas, USA	1:100	Citrat	APAAP

Tabelle 3: Verwendete Antikörper, Verdünnung, Puffer und Färbemethode

Die immunhistochemische Expression Aurora B, IGF-1R und STAT3 wurde bei allen vorhandenen Tumormaterialien untersucht. FOXM1 wurde in einem anderen Projekt unserer Arbeitsgruppe mit einem anders definierten Patientenkollektiv gefärbt, wobei Überschneidungen mit dem hier dargestellten Kollektiv bestanden.

3.2 Methodik

3.2.1 Behandlung des Tumormaterials

Die Gewebeproben (Primärtumor und Metastasen) wurden in Formalin fixiert, mit Paraffin aufbereitet und untersucht. Auswertbar waren nur Präparate, wenn Tumorgewebe und gesundes Gewebe auf den Schnitten in repräsentativer Weise beurteilbar waren. Das Tumormaterial wurde im Rahmen der histologischen Routineuntersuchung hinsichtlich der Expression von Ki-67 (MIB-1) durch die jeweiligen

Institute für Pathologie untersucht. Die Ergebnisse sind aus den entsprechenden Befunden entnommen. Alte Fälle, bei denen Ki-67 in der histopathologischen Routine-Befundung fehlte, wurden im Rahmen dieser Arbeit nachträglich dem immunhistochemischen Nachweis mit MIB-1 unterzogen. Soweit Gewebsmaterialien für eine repräsentative Auswertung der Morphologie in ausreichender Menge vorhanden waren, wurden sie hinsichtlich des Färbecharakters auf Survivin, Aurora B, IGF-1R, FOXM1 und STAT3/pSTAT3 untersucht. Da im Kollektiv auch nur kleinere Tumorbiopsate zur Verfügung standen, reichte das verfügbare Tumormaterial nicht in jedem Fall aus um alle Zielstrukturen zu untersuchen.

Als Positivkontrolle wurden Gewebeproben anderer Tumorentitäten verwendet, die eine bekannte Immunreaktivität für das gesuchte Antigen aufweisen. Als Negativkontrolle wurde Tumormaterial aus dem Kollektiv verwendet, dabei wurde der Primärantikörper gegen Entwicklungspuffer ersetzt.

Zielstruktur	Positivkontrolle
Aurora Kinase B	Ösophaguskarzinom
Survivin	Kolonkarzinom
IGF-1R	Kolonkarzinom
STAT3	Osteosarkom
FOXM1	Tonsille

Tabelle 4: Verwendete Positivkontrollen

Vorbereitung: Die Gewebsschnitte wurden im Rahmen einer ausgedehnten Vorbereitungsprozedur für 10-20 min in einer Xylol-Lösung entparaffiniert. Danach erfolgte zur Rehydratation die Behandlung der Präparate in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 80% und 70% Ethanol). Unter Vakuumbedingungen wurden sie in einer Pufferlösung erhitzt. Dadurch wurden die Antigene thermisch demaskiert. Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua bidestilata gewaschen. Zur Unterdrückung der endogenen Peroxidase-Aktivität erfolgte danach die Blockung mit 3%-iger Wasserstoffperoxidase-Lösung für 30 min. Hiernach wurden die Schnitte in EDTA-Pufferlösung gelegt. Die so behandelten Gewebsschnitte wurden im Anschluss mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert.

3.2.2 Immunhistochemie

In der Immunhistochemie werden molekulare Strukturen auf der Grundlage von Antikörper-Antigen-Affinität histologisch zur Darstellung gebracht. Hierfür kommen Antigene zum Einsatz, die gegen diese Strukturen gerichtet sind. Die Antikörper sind entweder mit einem Farbstoff markiert oder werden mit einem Enzym gebunden. Durch eine Farbreaktion wird das gesuchte Antigen sichtbar gemacht. Im Folgenden werden die verschiedenen immunhistochemischen Detektionssysteme erläutert, die in dieser Arbeit zum Einsatz gekommen sind.

Avidin-Biotin-Methode (ABC): Es handelt sich um eine enzymatische Methode (Hsu 1990), bei der die starke Bindungsaffinität des Glykoproteins Avidin bzw. Streptavidin mit Biotin ausgenutzt wird. Avidin besitzt 4 Bindungsstellen für Biotin. Der Brückenantikörper wird mit Biotin gekoppelt und mit dem Primärantikörper zusammengebracht. In biotinylierter Form reagieren die Antikörper mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex an das gewebsgebundene Antigen. Über die Peroxidase erfolgt die Farbreaktion. Vorteil dieser Methode ist die hohe Sensitivität, weil eine hohe Konzentration an biotinylierte Peroxidase gebunden werden kann. Der Nachteil ist, dass Organe wie Leber, Niere oder Pankreas Biotin enthalten. Die Bindung des endogenen Biotins mit Avidin führt hier zu falsch positiver Reaktion.

Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase-Komplex (APAAP): Die immunhistochemische Methode mit Peroxidase-Antiperoxidase wurde 1977 von Sternberger (Sternberger et al. 1977) entwickelt. Das nachzuweisende Antigen wird vom dem Primärantikörper im ersten Schritt gebunden. An dem Primärantikörper bindet sich der Sekundärantikörper, der wiederum im nächsten Schritt vom APAAP-Komplex gebunden wird. Dadurch wird eine Signalverstärkung erreicht. Der dadurch entstandene Komplex wird durch ein Enzymsubstrat (DAB) visualisiert. So können mit dieser Methode auch geringe Mengen von Antigenen zur Darstellung gebracht werden.

3.2.3 Durchführung

Behandlung mit Antikörper und Visualisierung der Zielstruktur

Nach der Inkubationszeit erfolgte die Behandlung mit dem Brückenantikörper und der alkalischen Phosphatase (APAAP-Methode) oder der Streptavidin Peroxidase (ABC-Methode) für jeweils 30 min.

Bei der APAAP-Methode (zum Nachweis von Ki-67, FOXM1 und STAT3/Phospho-STAT3) erfolgte zunächst eine 30 minütige Inkubation mit dem in einem Kit vorhandenen sekundären Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin (Brückenantikörper). Danach erfolgte die 30-minütige Behandlung mit dem alkalischen-Phosphatase-Antialkalische Phosphatase-Komplex. Für die Entwicklung der Farbreaktion wurden der im Kit enthaltenen Substratpuffer (10ml) mit 1 Tropfen Levamisol zugesetzt. Der so entstandenen Lösung wurde in der Konzentration 1:250 Chromogen RED 1, 2 und 3 zugegeben. Anschließend erfolgte damit eine 20-minütige Inkubation in der feuchten Kammer.

Bei der ABC-Methode (zum Nachweis von Survivin, Aurora B und IGF-1R) erfolgte die Inkubation mit Biotin-konjugiertem Anti-Rabbit-Immunglobulin (Brückenantikörper) für 30 min, danach die Behandlung mit dem Peroxidase konjugierten Avidin-Biotin-Komplex. Im Anschluss wurden die Schnitte mit DAB-Substratlösung („Entwicklerlösung“) für 10 min behandelt.

Zum Schluss erfolgte bei beiden Methoden das Gegenfärben mit Hämalaun für 1 Minute. Nach dem vorsichtigen Abspülen mit warmem Leitungswasser wurden die Schnitte mit einem Tropfen Kaiser Glyzerin Gelatine eingedeckelt.

Als Spüllösung zwischen den einzelnen Schritten wurden in allen Färbereihen 0,05M Trisgepufferte NaCl-Lösung verwendet.

Tabelle 6 zeigt eine Übersicht über Anzahl der untersuchten und Gewebeproben. Nicht berücksichtigt wurden Fälle, bei denen die Färbungen nicht aussagekräftig waren (beispielsweise nicht genügend Tumorgewebe auf einem Schnitt, unspezifische Färbereaktion, ungleichmäßige Verteilung der Antikörper).

Untersuchte Zielstruktur	Anzahl
Aurora Kinase B im Zytosol	75
Aurora Kinase B im Nukleus	75
Survivin im Zytosol	75
Survivin im Nukleus	75
IGF-1R membranös	60
FOXM1	30
STAT3 im Nukleus	52
pSTAT3 im Nukleus	52
Ki-67 (Nachfärbung)	17

Tabelle 5: Übersicht über Anzahl der Tumorpräparate, die jeweils immunohistochemisch behandelt worden sind und auch in die statistische Auswertung eingegangen sind. Die Ki-67-Färbung wurde in 17 Fällen bei fehlender Angabe in der histopathologischen Routine-Befundung ergänzt. Alle Arbeitsschritte der immunohistochemischen Färbung, außer FOXM1, wurden selbstständig durchgeführt.

3.3 Auswertung und Quantifizierung

3.3.1 Auswertung am Mikroskop

Die mikroskopische Auszählung wurde mit dem Gerät Olympus BH2 in der Vergrößerung 1:100 und 1:400 vorgenommen. Zunächst wurde das gesamte Präparat in der groben Vergrößerung in Übersicht angeschaut. Die gesunden Zellen des Ursprungsgewebes dienen dabei als Positivkontrolle der Färbung. Anschließend wurden in 3 Gesichtsfeldern die mit dem Antikörper markierten Tumorzellen ausgezählt. Berücksichtigt wurden dabei nur Schnitte, die eine eindeutige Färbung aufwiesen. Präparate, die zu wenig Tumorgewebe aufweisen, wurden als nicht interpretierbar gewertet. Die Färbung wurde in dem Fall wiederholt. Die mikroskopische Auswertung wurde zunächst von zwei Untersuchern ohne Kenntnis der klinischen Daten unabhängig voneinander vorgenommen (Yawen Wang und PD Dr. med. Patricia Grabowski). Zusätzlich wurden die Präparate einem dritten Untersucher des Instituts für Pathologie der Charité Campus Mitte (PD Dr. med. Ruza Arsenic) vorgelegt. Bei voneinander abweichenden Ergebnissen wurde das Präparat gemeinsam mikroskopisch reevaluiert und eine Einigung erreicht.

Quantifizierung der Färbung bei Aurora B, Survivin und Ki-67: Die Tumorzellen wurden in drei zufällig gewählten Gesichtsfeldern ausgezählt. Die Auswertung gilt im

Fall von Survivin als positiv für den entsprechenden Antikörper, wenn mindestens 5% der Tumorzellkerne eine intensive Färbung aufzeigen (Kawasaki et al. 1998 und Grabowski et al. 2005). Zum Zeitpunkt der Färbung existierte noch kein publiziertes Quantifizierungssystem für Aurora Kinase B. Wir haben zwischen positiver Immunreaktivität im Zytosol und im Nukleus unterschieden. Eine nukleäre Expression ist positiv, wenn 5% der Tumorzellkerne eine kräftige und eindeutige Expression gezeigt haben. Die Ki-67-Auszählung wurde im Rahmen der Routinediagnostik im jeweiligen Institut für Pathologie vorgenommen und aus den histopathologischen Befunden übernommen. Bei fehlender Angabe von Ki-67, wurde die Färbung entsprechend nachgeholt und als Index positiver Zellen betrachtet. Eine positive Reaktivität liegt vor, wenn der Kern kräftig markiert ist, die prozentuale Angabe entsprechend auf 100 Tumorzellkerne gerechnet.

Quantifizierung der Färbung bei IGF-1R: In der Literatur existieren diverse Scoring-Systeme für die immunhistochemische Auswertung von IGF-1R-Färbungen. Oftmals findet sich ein Kombinationssystem aus Proportions- und Intensitäts-Score (Lloret et al. 2007, Ouban et al. 2003). Um den Grad der Subjektivität bei der verblindeten Auswertung durch zwei unabhängige Untersucher zu minimieren, dem Expressionsverhalten des Rezeptors aber trotzdem gerecht zu werden, wurde in der vorliegenden Arbeit ein vereinfachtes Auswertungssystem implementiert: Anlehnend an die Arbeit von Heskamp *et al.* wurde eine positive membranöse Reaktivität als 0 (negativ), 1+ (schwach positiv), 2+ (moderat positiv), 3+ (stark positiv) bewertet (Heskamp et al. 2015). Die zytoplasmatische Färbereaktion wurde in unserer Arbeit nicht berücksichtigt (unter der Hypothese, dass es sich hier um den internalisierten, inaktiven Rezeptor handelt).

Quantifizierung der Färbung bei FOXM1: In der Literatur wurde der positiven Reaktivität im Zellkern und im Zytoplasma eine wichtige Rolle in der Tumorgenese zugeschrieben (Ha et al. 2012 und Hui et al. 2012). Wir haben daher in unserer Arbeit ein dichotomisierendes Score-System angewandt, welches sowohl die nukleäre, als auch die zytoplasmatische Immunreaktivität berücksichtigt: Die Immunreaktivität im Zytoplasma wurde entsprechend der Färbeintensität eingeteilt in 0 (keine positive Färbeantwort), 1 (schwache Färbung), 2 (moderate Färbung) und 3 (starke Färbung) quantifiziert. Nur die mit "2" und "3" bewertete Färbereaktionen im Zytoplasma wurden im Score-System als positiv betrachtet.

Eine als positiv bewertete nukleäre und zytoplasmatische Reaktivität wurde gemeinsam aufaddiert. Bei Scores ≥ 2 wurden die Färbereaktion als "stark" bewertet (Briest et al. 2015).

Quantifizierung der Färbung bei STAT3: Bei der Quantifizierung der STAT3- Färbung berücksichtigt das Score-System nukleäre und zytoplasmatische Expression: 0 (keine), 1 (schwache), 2 (moderate) und 3 (starke) Immunreaktivität. Auch hier wurde dichotomisiert und eine > 2 eingestufte Immunreaktivität als „starke Expression“ gewertet (Briest et al. 2015).

3.3.2 Statistische Auswertung

Die klinisch-pathologischen Daten wurden zunächst in eine Excel-Datenbank aufgenommen und anschließend für die statistische Auswertung codiert. Für die statistische Auswertung wurden nichtparametrische, parametrische, sowie Korrelations-tests mithilfe der Software IBM SPSS statistics (Version 22.0) durchgeführt. Alle erhobenen Daten wurden einer deskriptiven Analyse unterzogen. Zur Überprüfung einer Assoziation zwischen nominalen abhängigen Variablen wurde der CHI^2 -Test verwendet. Der exakte Fisher-Test wurde bei dichotomisierten Variablen mittels Kreuztabellen angewandt. Die Schätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit wurde mit der Kaplan-Meier-Methode ermittelt. Der Vergleich zwischen den Überlebensgruppen erfolgte mit dem Log-Rank-Test. Eine statistische Signifikanz lag vor, wenn $P < 0,05$ betrug. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse wurden unabhängige Prognoseparameter ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1. Plausibilitätsprüfung des Patientenkollektivs

Das Kollektiv wurde in dessen Zusammensetzung mit bekannten prognostisch relevanten Parametern wie Grading und Metastasenstatus auf Plausibilität überprüft. Erwartungsgemäß zeigten die Gruppe der Patienten mit schlecht differenzierten G3-Tumoren bzw. mit positivem Metastasen-Status in der Gesamtüberlebensrate ein schlechteres Outcome als Patienten mit G1- und G2- Tumoren bzw. ohne Metastasen.

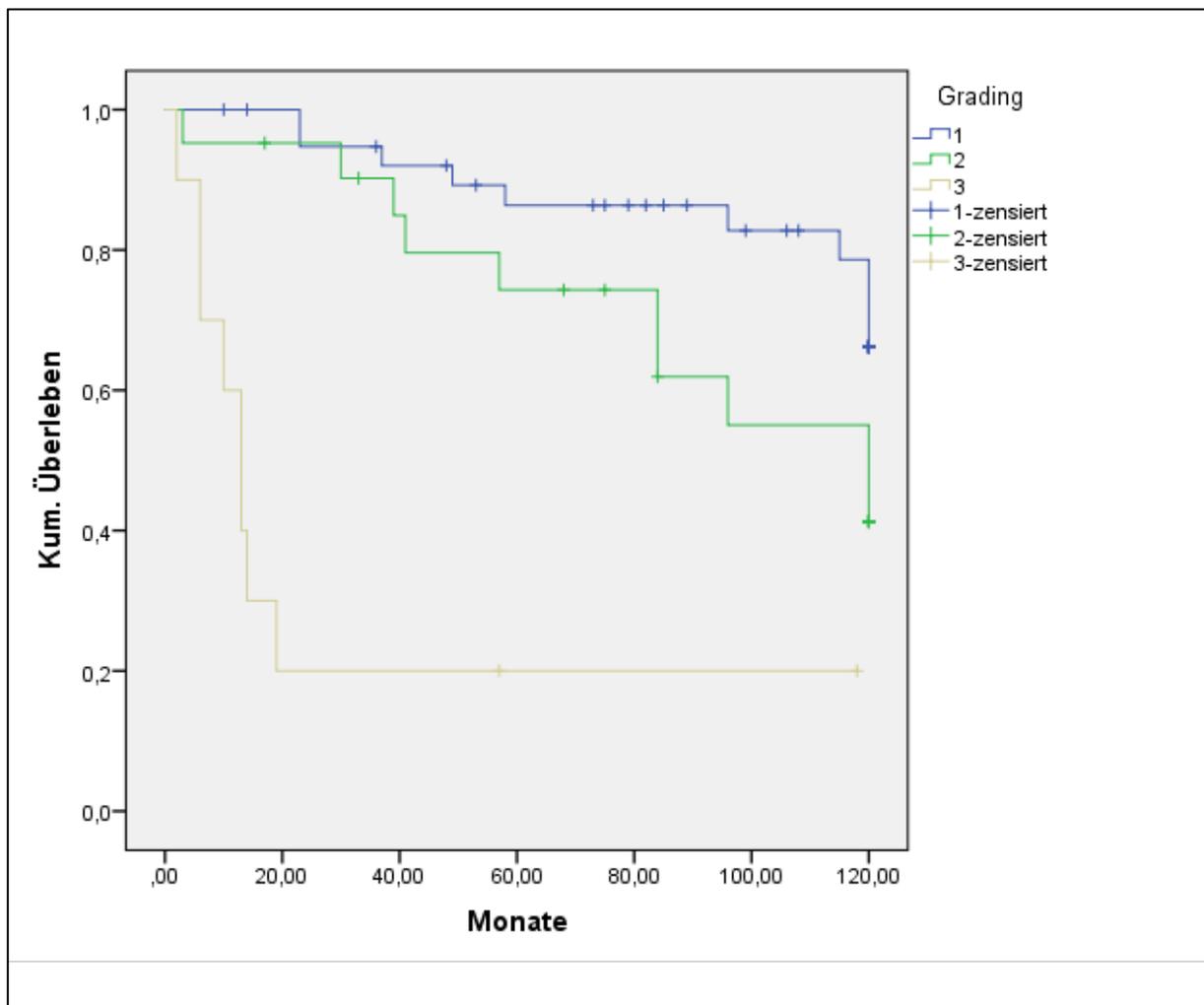


Diagramm 2: Überlebensfunktion in Abhängigkeit mit Grading

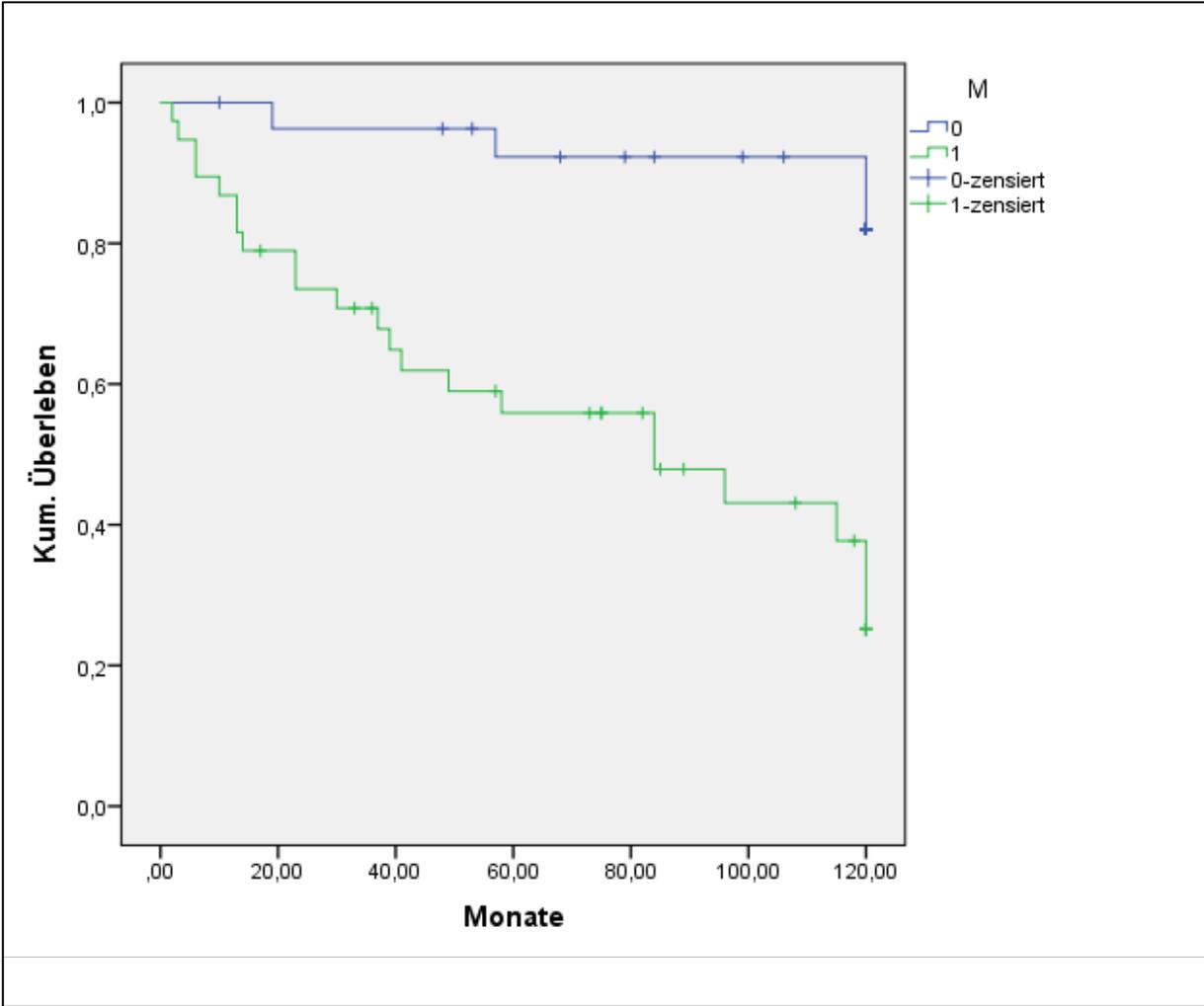


Diagramm 3: Überlebensfunktion Metastasenstatus

4.2. Deskriptive Statistik

4.2.1 Grading-, Geschlechter- und Altersverteilung

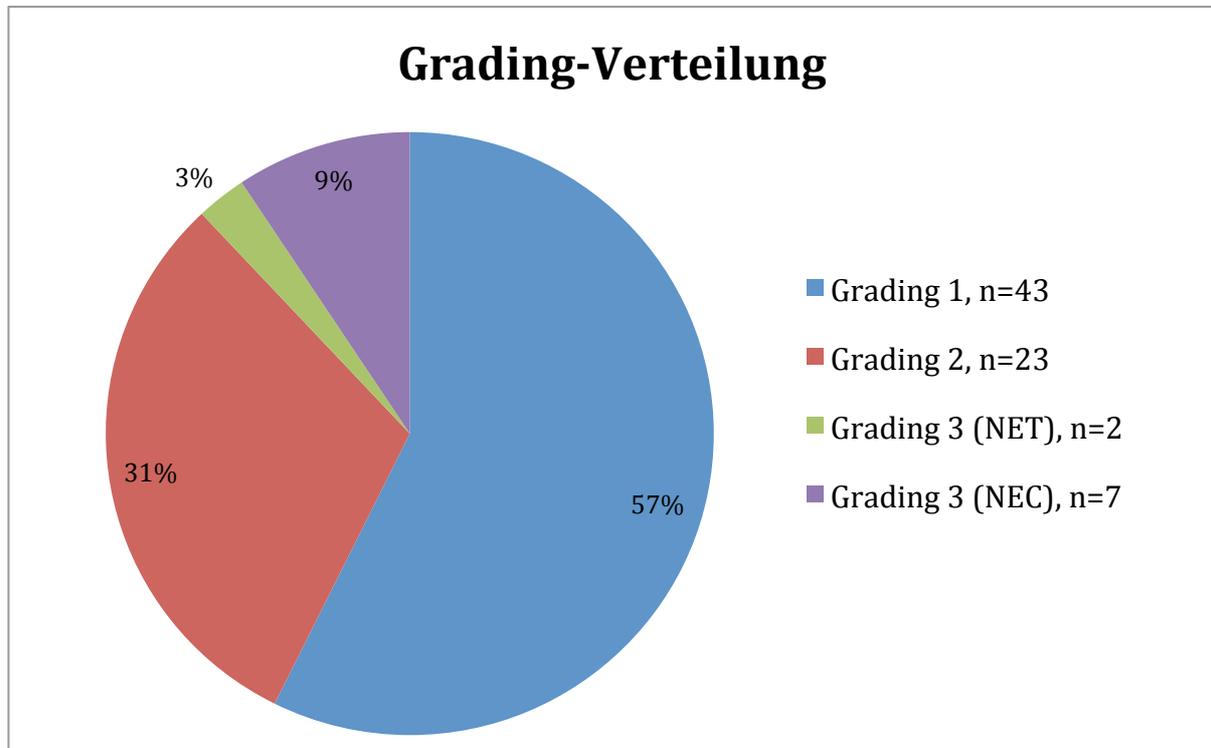


Diagramm 4: Häufigkeit der Grading-Verteilung innerhalb des Kollektivs

	Anzahl	Durchschnitts- alter (Jahre)	Geschlecht männlich	Geschlecht weiblich
Grading 1	43	54,6	20	23
Grading 2	23	56,9	8	15
Grading 3	9	52,2	8	1
- G3 NET	2	50,5	2	0
- G3 NEC	7	53,9	6	1

Tabelle 6: Alters- und Geschlechterverteilung, inklusive Unterscheidung NET G3/NEC G3

4.3 Immunreaktivität und Expressionsverhalten

Mit den Ergebnissen der immunhistochemischen Untersuchungen soll das Expressionsverhalten Zellzyklus-spezifischer Proteine untereinander und im Zusammenhang mit klinisch relevanten Parametern beschrieben und dargestellt werden.

4.3.1 Expressionsverhalten von Aurora Kinase B in GEP-NEN

Nukleäre Immunreaktivität: Die Immunhistochemische Untersuchung zeigt, dass gut differenzierte G1- und G2-Tumore anteilmäßig keine relevante Aurora B- Expression im Kern aufweisen: Von 43 G1 NET zeigten nur 2 Fälle eine positive nukleäre Reaktion (4,7%). Alle G2-Tumore waren negativ bezüglich einer nukleären Aurora B-Expression (0%). G3-Tumore, vor allem die schlecht differenzierten G3 NEC dagegen zeigen zu einem hohen Anteil eine positive nukleäre Immunreaktivität (85,7%). 1 von 2 G3 NET war ebenfalls nukleär positiv (50%). Die nukleäre Immunreaktivität von Aurora B ist in der univariaten Analyse mit Grading signifikant ($p=0,000$).

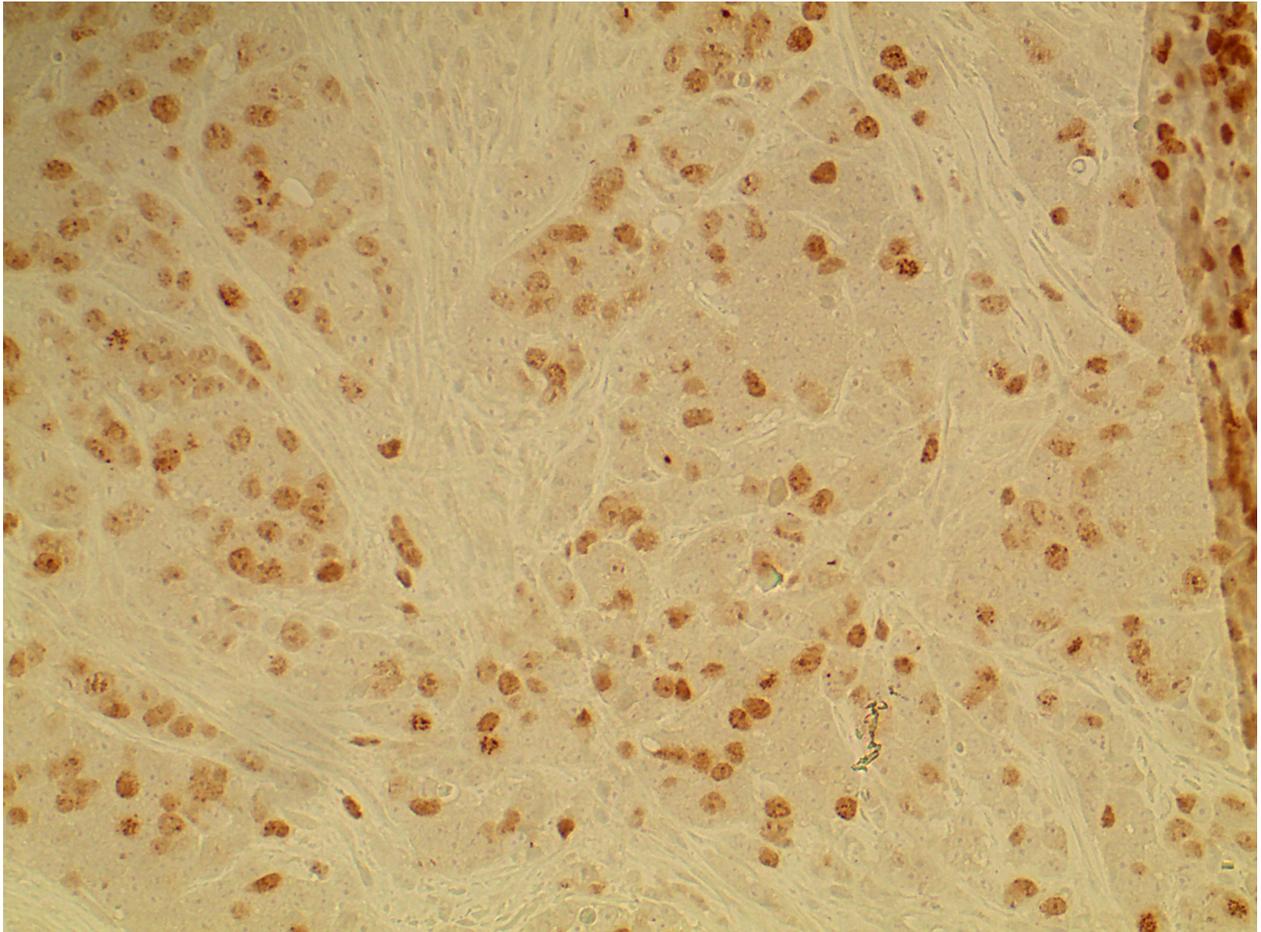


Abbildung 6: Positive Immunreaktivität von Aurora Kinase B im Kern, Magen, G3, 10X10

		Aurora Kinase B im Kern	
		<5% (=negativ)	>5% (=positiv)
Grading 1	N (%)	41/43 (95,3%)	2/43 (4,7%)
Grading 2	N (%)	23/23 (100,0%)	0/23 (0,0%)
Grading 3	N (%)	2/9 (22,2%)	7/9 (77,8%)
- G3 NET	N (%)	1/2 (50,0%)	1/2 (50,0%)
- G3 NEC	N (%)	1/7 (14,3%)	6/7 (85,7%)

Tabelle 7: Nukleäre Immunreaktivität von Aurora Kinase B in den G1-, G2- und G3-Gruppen

Zytosolische Immunreaktivität: Im Gegensatz zur nukleären Expression, die vor allem bei G3-Tumoren positiv waren, ist die Immunreaktivität im Zytosol vor allem bei gut differenzierten G1- und G2-Tumoren positiv. G3-Tumore zeigen kaum Expression von Aurora Kinase B im Zytosol. In der univariaten Analyse ist die Expression von Aurora B im Zytosol signifikant ($p=0,003$).

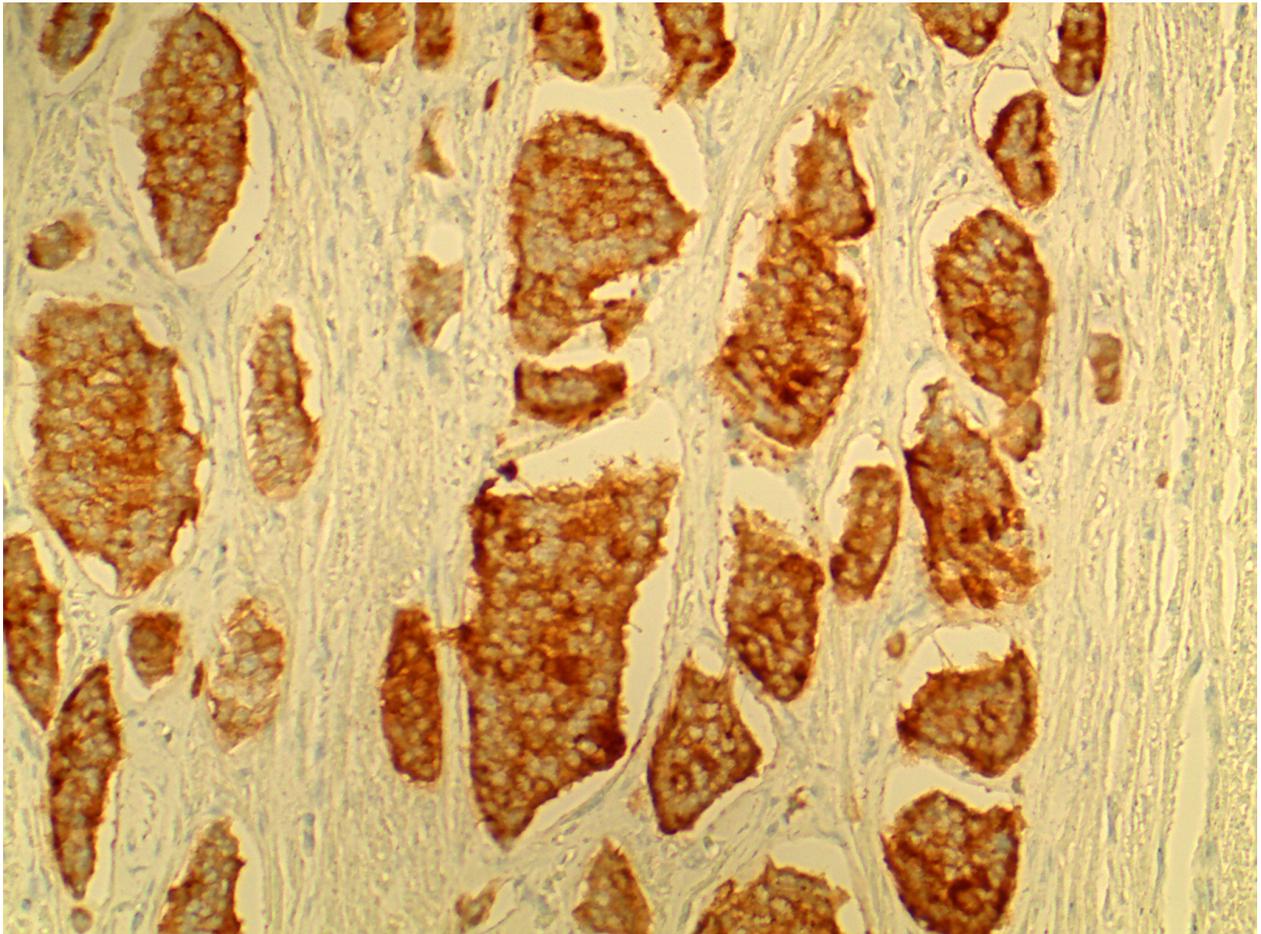


Abbildung 7: Positive zytosolische Immunreaktivität von Aurora Kinase B, Dünndarm, G1, 30X30

		Aurora Kinase B im Zytosol	
		negativ	positiv
Grading 1	N (%)	10/43 (23,3%)	33/43 (76,7%)
Grading 2	N (%)	9/23 (39,1%)	14/23 (60,9%)
Grading 3	N (%)	8/9 (88,9%)	1/9 (11,1%)
- G3 NET	N (%)	2/2 (100%)	0/2 (0,0%)
- G3 NEC	N (%)	6/7 (85,7%)	1/7 (14,3%)

Tabelle 8: Zytosolische Immunreaktivität von Aurora Kinase B in den G1-, G2- und G3-Gruppen

Zwischen der Expression von Aurora B im Kern und Zytosol besteht somit eine inverse Korrelation ($p=0,001$, exakter Test nach Fisher).

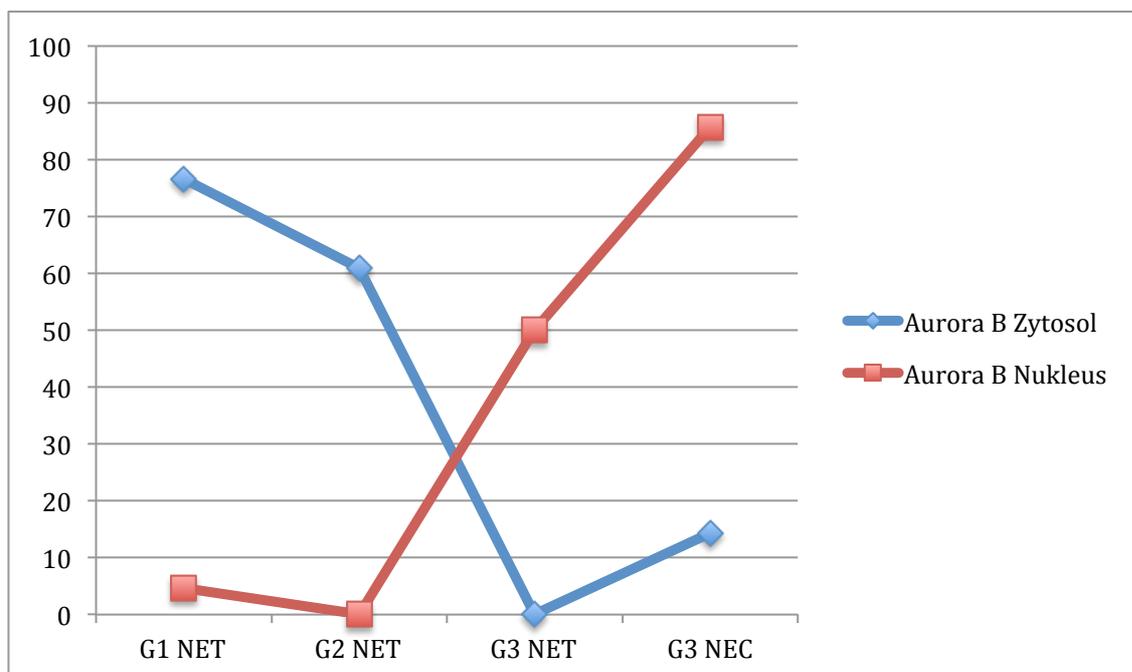


Diagramm 5: Aurora Kinase B im Zytosol und Nukleus in inverser Wechselbeziehung.

4.3.2 Expressionsverhalten von Survivin in GEP-NEN

G1-Tumore zeigen keine nukleäre Immunreaktivität mit dem Survivin-Antikörper. G3-Tumore dagegen zeigen alle eine positive Expression im Kern. In der univariaten Analyse korreliert die nukleäre Expression von Survivin signifikant mit dem Grading ($p=0,000$).

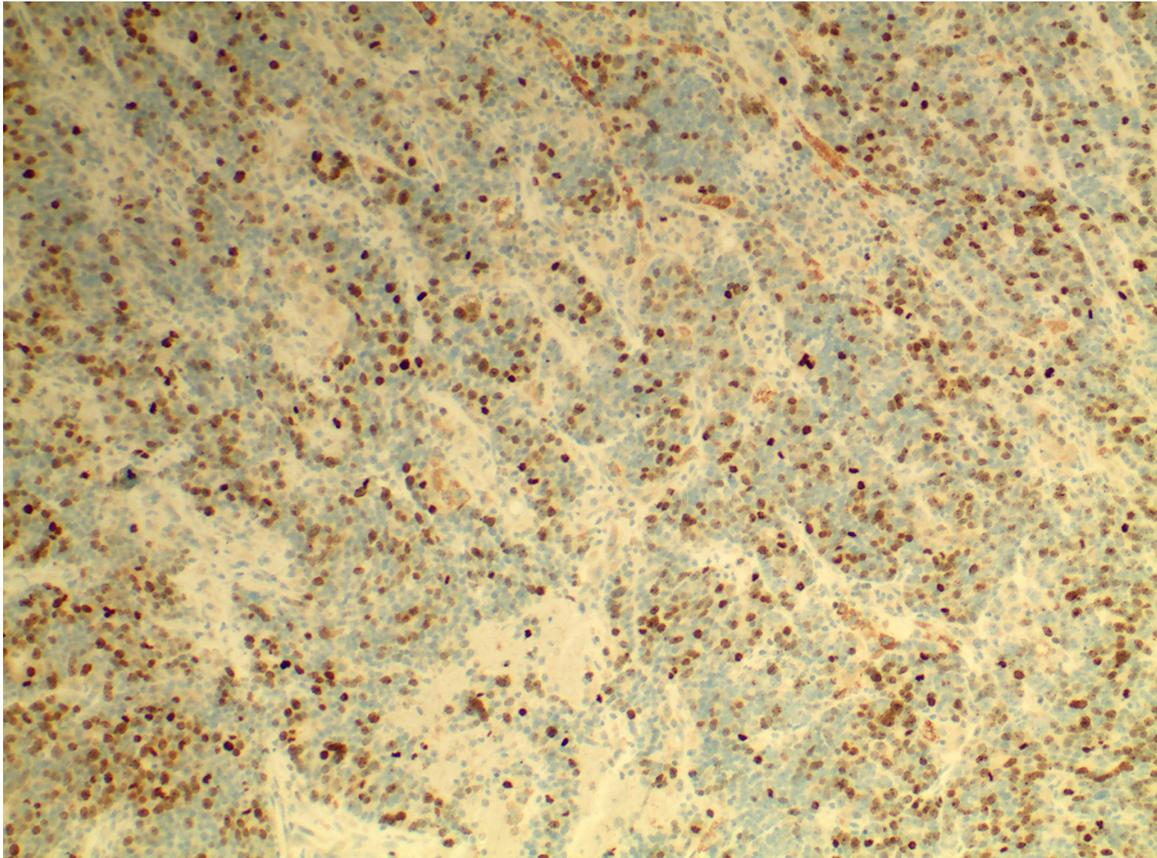


Abbildung 8: Positive nukleäre Immunreaktivität von Survivin, Lebermetastase, G3, 30X10

		Survivin im Kern	
		negativ	positiv
Grading 1	N (%)	43/43 (100%)	0/43 (0,0%)
Grading 2	N (%)	19/23 (82,6%)	4/23 (17,4%)
Grading 3	N (%)	0/9 (0,00%)	9/9 (100,0%)
- G3 NET	N (%)	0/2 (0,00%)	2/2 (100,0%)
- G3 NEC	N (%)	0/7 (0,00%)	7/7 (100,0%)

Tabelle 9: Nukleäre Immunreaktivität von Survivin in den G1-, G2- und G3-Gruppen

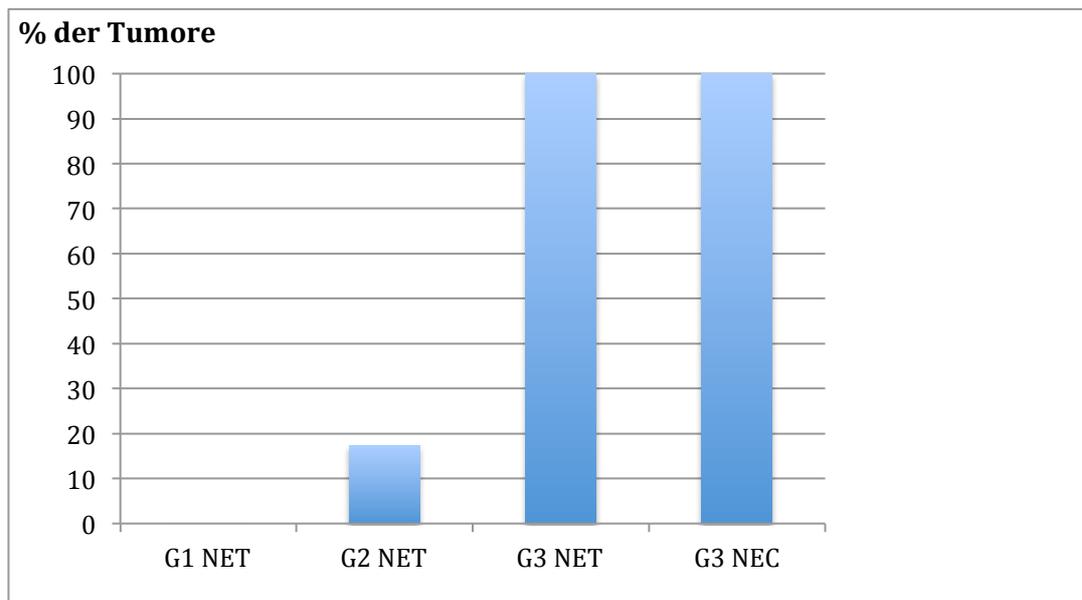


Diagramm 6: Survivin-Expression im Kern in G1, G2 und G3 NENs

4.3.3 Expressionsverhalten von IGF-1R in GEP-NEN

Fast alle Tumore der G1-Gruppe zeigten keine membranöse IGF-1R-Expression (94,3% negativ und 5,7% positiv). Auch die meisten Tumore der G2-Gruppe waren IGF-1R- negativ (85%). In der Gruppe der G3-Tumore waren 40% positiv. In der univariaten Analyse zeigt sich keine Signifikanz für die IGF-1R- Expression ($p=0,064$).

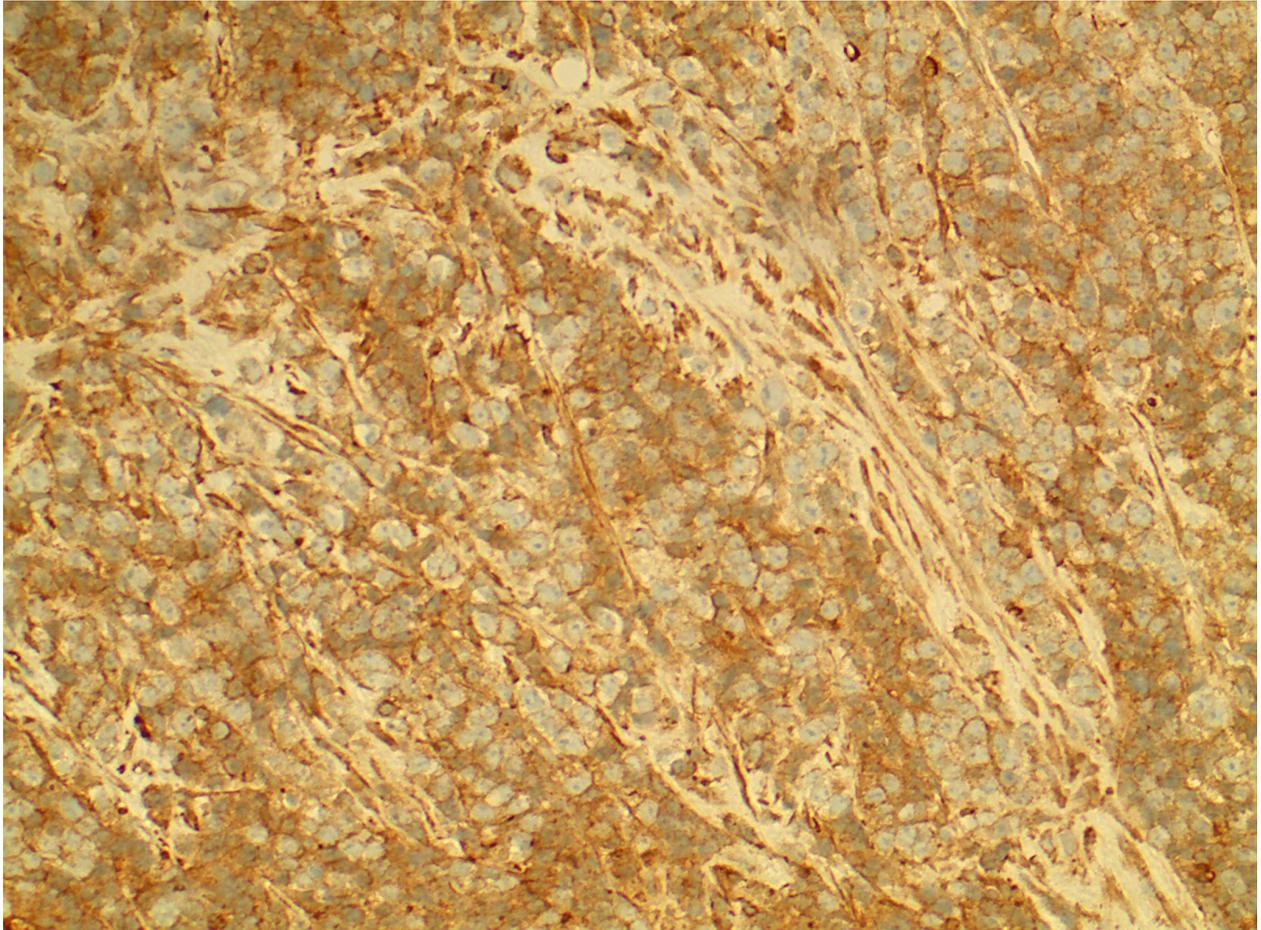


Abbildung 9: Positive membranöse Immunreaktivität von IGF-1R, Magen, G3, 30X10

		IGF-1R Expression	
		negativ	positiv
Grading 1	N (%)	33/35 (94,3%)	2/35 (5,7%)
Grading 2	N (%)	17/20 (85,0%)	3/20 (15,0%)
Grading 3	N (%)	3/5 (60,0%)	2/5 (40%)
- G3 NET	N (%)	1/1 (100,0%)	0/1 (0,0%)
- G3 NEC	N (%)	2/4 (50,0%)	2/4 (50,0%)

Tabelle 10: Immunreaktivität von IGF-1R in den G1-, G2- und G3-Gruppen

4.3.4 Expressionsverhalten von FOXM1 in GEP-NEN

Exemplarisch wurden 30 Tumore immunhistochemisch auf die Expression von FOXM1 untersucht. Gut differenzierte G1 NETs exprimieren kein FOXM1. In den G3-Subgruppen dagegen war die Expression hoch. Das Expressionsverhalten von FOXM1 korreliert in der univariaten Analyse signifikant mit dem Grading ($p=0,038$).

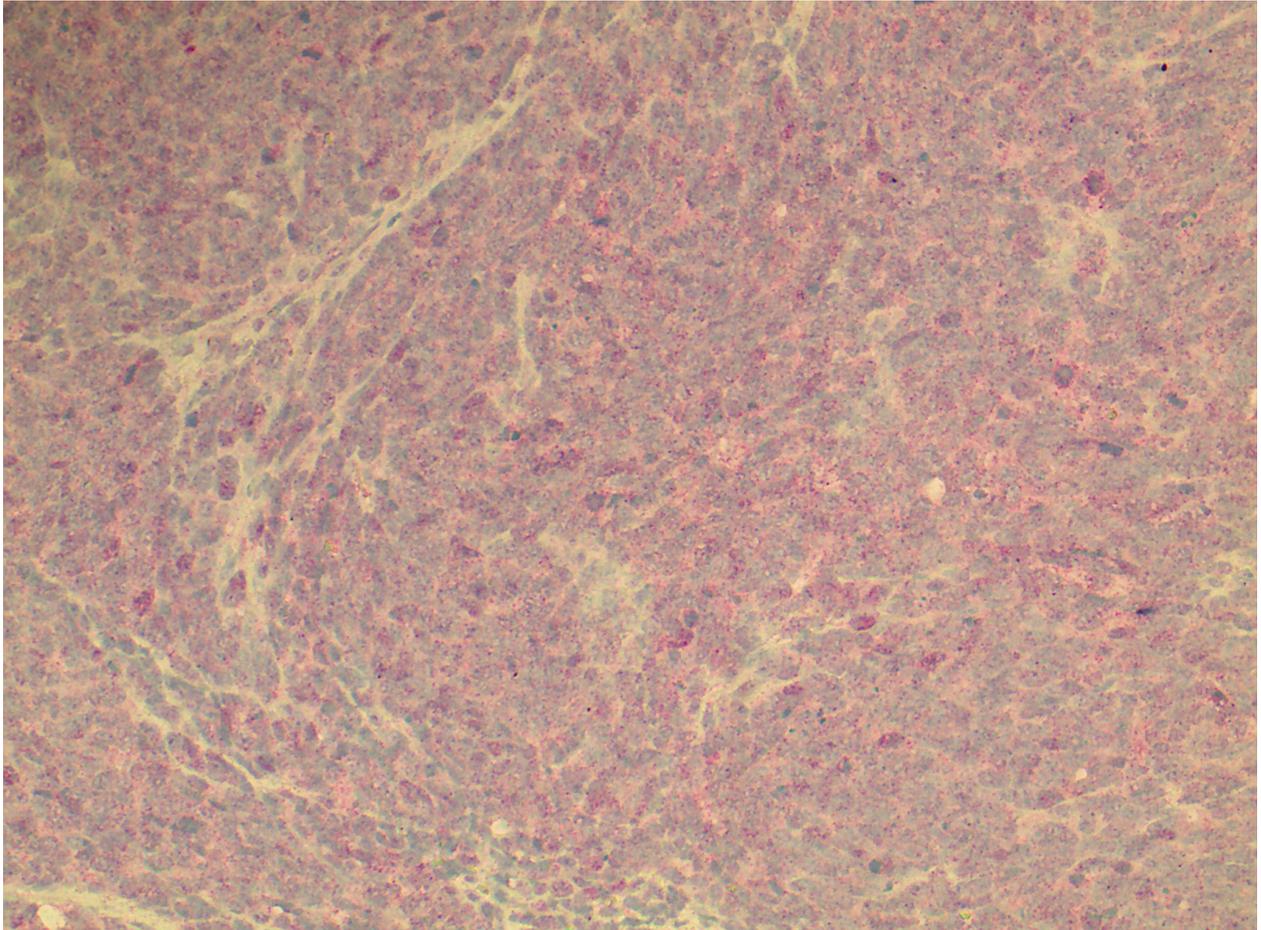


Abbildung 10: Positive Reaktivität von FOXM1 im Kern, Sigma, G3, 30X10

		FOX M1 Expression	
		niedrig	hoch
Grading 1	N (%)	15/15 (100,0%)	0/15 (0%)
Grading 2	N (%)	6/8 (75,0%)	2/8 (25,0%)
Grading 3	N (%)	4/7 (57,1%)	3/7 (42,9%)
- G3 NET	N (%)	1/1 (100,0%)	0/1 (0,0%)
- G3 NEC	N (%)	3/6 (50,0%)	3/6 (50,0%)

Tabelle 11: Immunreaktivität von FOXM1 in den G1-, G2- und G3-Gruppen

4.3.5 Expressionsverhalten von STAT3 und pSTAT3 in GEP-NEN

In allen Grading-Gruppen war das Expressionsverhalten von STAT3 und pSTAT3 anteilmäßig nicht hoch und ist in der statistischen Auswertung nicht signifikant (STAT3 $p=0,546$, pSTAT $p=0,799$).

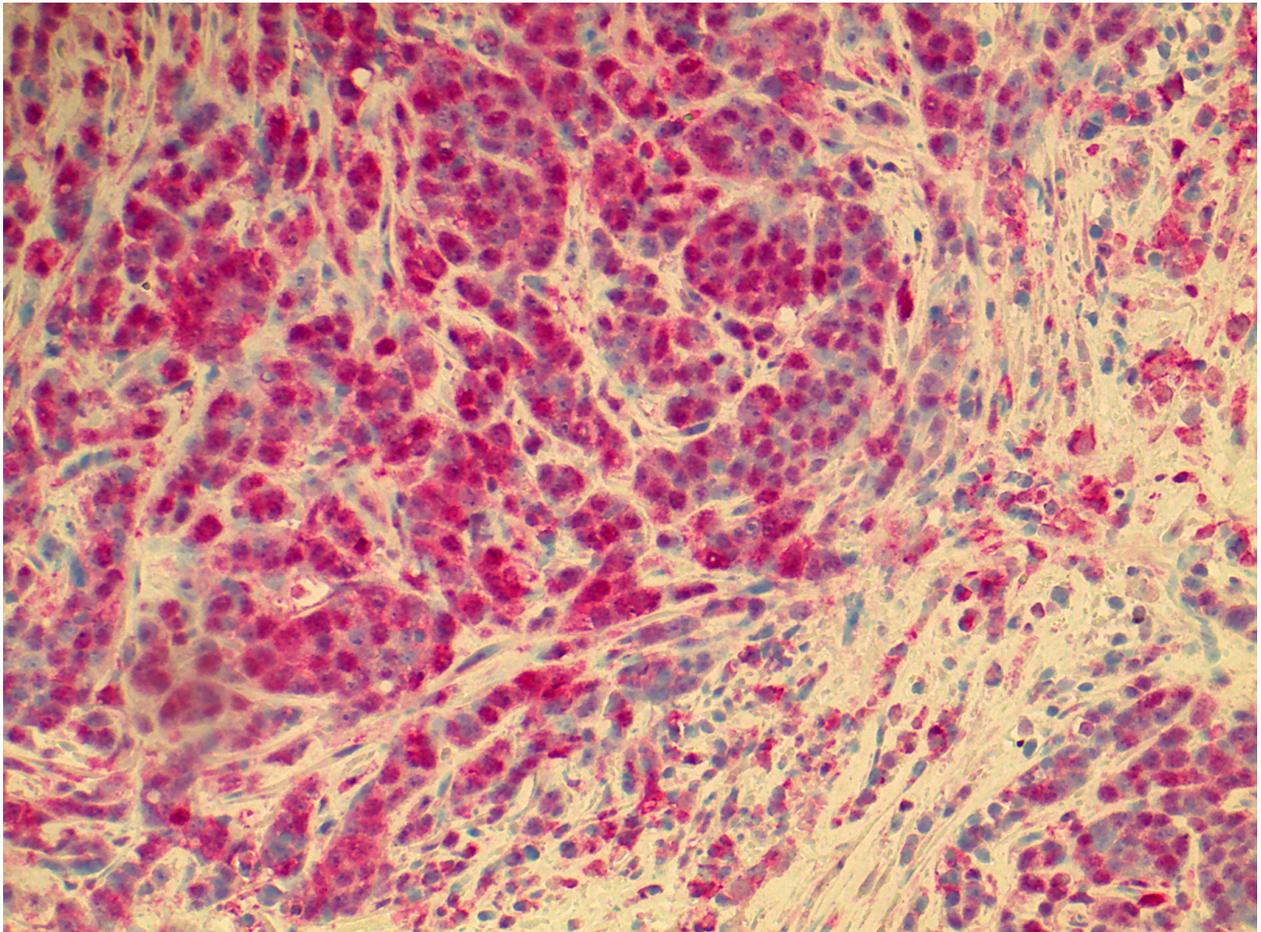


Abbildung 11: Positive Immunreaktivität von STAT3 im Kern, Magen, G3, 30X10

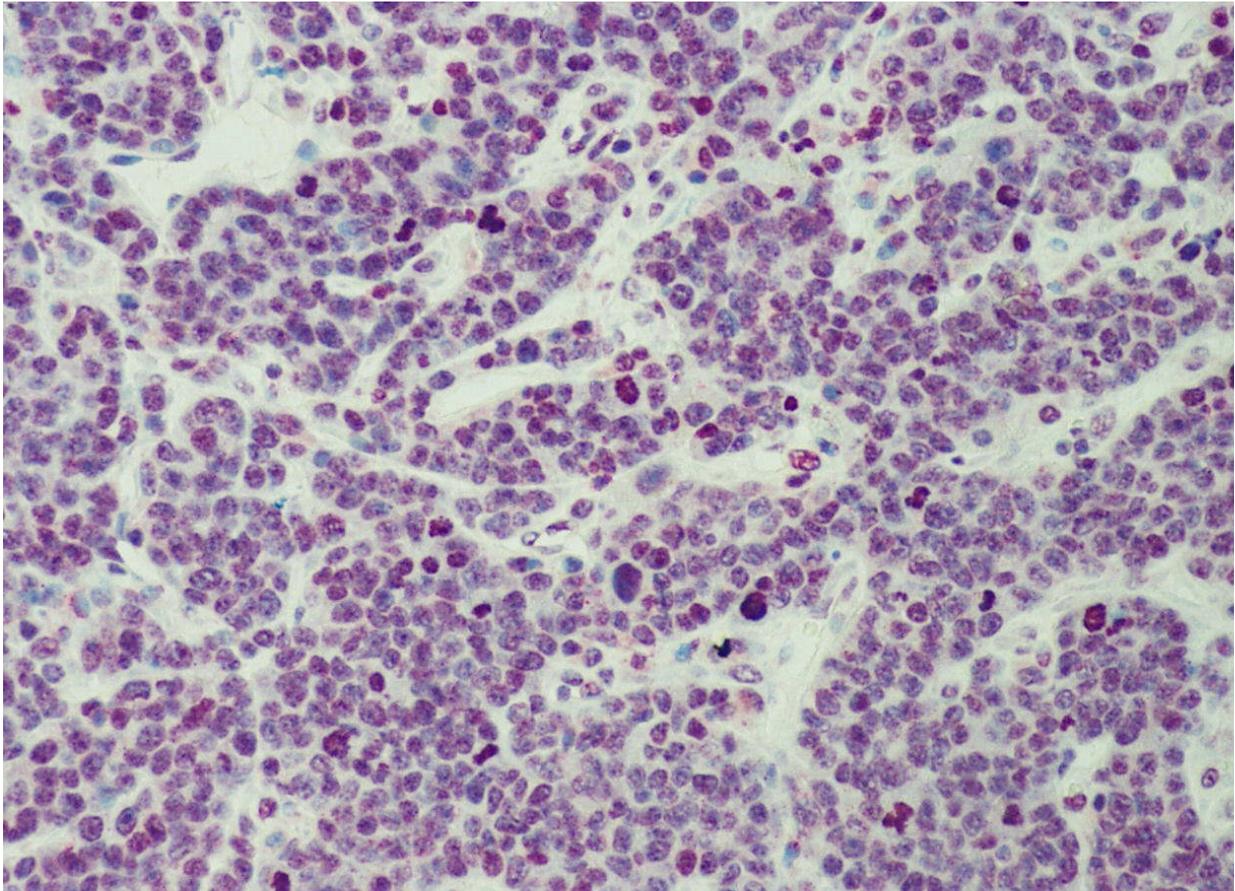


Abbildung 12: Positive Immunreaktivität von pSTAT3, Lebermetastase, G3, 30X10

		positive Expression	
		STAT3	pSTAT3
Grading 1	N	2/30	3/30
	(%)	(6,7%)	(10,0%)
Grading 2	N	2/13	2/13
	(%)	(15,4%)	(15,4%)
Grading 3	N	1/9	1/9
	(%)	(11,1%)	(11,1%)
- G3 NET	N	0/2	0/2
	(%)	(0,0%)	(0,0%)
- G3 NEC	N	1/7	1/7
	(%)	(14,3%)	(14,3%)

Tabelle 12: Immunreaktivität von STAT3 und pSTAT3 in den G1-, G2- und G3-Gruppen

4.4. Korrelationen im Expressionsverhalten

Im ersten Schritt der Auswertung wurden die Zielstrukturen auf deren statistische Signifikanz zum Grading und somit zur Proliferationsrate untersucht. In einem zweiten Schritt wurden die Zielproteine Aurora Kinase B, Survivin und FOXM1 auf deren Korrelation zueinander geprüft. Dabei kann festgestellt werden, dass hohe Expression von nukleärer Aurora Kinase B mit hoher Expression von FOXM1 ($p=0,041$) und nukleärem Survivin ($p=0,000$) korreliert. Die Expression von Aurora Kinase B im Zytosol zeigt dagegen eine inverse Korrelation zu deren nukleärer Expression ($p=0,001$) und zum nukleären Survivin ($p=0,000$). Für die Zielproteine IGF-1R, STAT3, sowie pSTAT3 konnte keine signifikante Korrelation mit Expression von Aurora Kinase B festgestellt werden.

	Aurora B Kern	Survivin Kern	FOXM1	IGF-1R	STAT3	pSTAT3
Aurora B Zytosol	N=75 p=0,001 invers	N=75 p=0.000 invers	N=30 n.s.	N=60 n.s.	N=52 n.s.	N=52 n.s.
Aurora B Kern	N=75 /	N=75 p=0,000	N=30 p=0,041	N=60 n.s.	N=52 n.s.	N=52 n.s.

Tabelle 13: Tabellarische Zusammenfassung relevanter Ergebnisse der immunhistochemischen Korrelationsanalyse. **Felder mit statistischer Signifikanz sind blau markiert.**

4.5. Korrelationen des Expressionsverhaltens mit klinischen Parametern

In einer vorausgegangenen Publikationsarbeit (Grabowski et al. 2005) wurde bereits der Zusammenhang zwischen nukleärer Expression von Survivin und schlechtem Tumorverhalten vermutet. Der Nachweis von Survivin im Zellkern zeigte in einer metastasierten Subgruppe der WHO 2-Patienten einen deutlich schlechteren Krankheitsverlauf als Ki-67 allein. Im vorliegenden Kollektiv, welches das Ursprüngliche ergänzte und der neuen WHO-Klassifikation angepasst wurde, erfolgte im Rahmen der

statistischen Auswertung die Untersuchung des Expressionsmusters der Proteine auf deren Korrelation zu den klinisch-pathologischen Parametern. Von Interesse waren hier Parameter wie Metastasen-Status und Tumorgröße.

4.5.1 Tumorgröße

Große Tumore (>2cm) sind assoziiert mit nukleärer Expression von Aurora B ($p=0,001$) und Survivin ($p=0,034$), sowie FOXM1 ($p=0,033$). Die zytosolische Expression von Aurora Kinase B oder Survivin ist statistisch nicht signifikant.

	Tumorgröße klein (<2cm)	Tumorgröße groß (>2cm)	Summe	p
AURORA B Kern	0/30 (0,0%)	8/24 (33,3%)	54	0,001
SURVIVIN Kern	3/30 (10,0%)	8/24 (33,3%)	54	0,034
FOXM1	0/11 (0,0%)	5/15 (33,3%)	26	0,033

Tabelle 14: Korrelation der Expression von Aurora Kinase B, Survivin, FOXM1 mit Tumorgröße

4.5.2 Metastasen

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wurden bei 51,5% der Patienten mit einem G1-Tumor Metastasen festgestellt, in der G2-Gruppe 66,9% und in der G3-Gruppe 88,9%. Bei allen Patienten mit einem G3 NEC lag zum Zeitpunkt der Diagnose bereits eine Metastasierung vor. Hinsichtlich des Vorliegens von Metastasen ergab die statistische Auswertung keine signifikante Korrelation mit der Expression von Aurora B und FOXM1. Die nukleäre Expression von Survivin ($p= 0,008$) und die membranöse Expression von IGF-1R ($p=0,032$) dagegen waren assoziiert mit dem Vorhandensein einer Metastase.

4.5.3 Funktionalität

Positive nukleäre Aurora B- und Survivin-Expression zeigten eine signifikante Korrelation mit der Funktionalität der Tumore und wurde vermehrt in funktionell inaktiven Tumoren nachgewiesen, die in der Regel auch schlechter differenziert sind.

	funktional aktiv	funktional inaktiv	Summe	p
Aurora B im Kern	0/23 (0,0%)	8/34 (23,5%)	57	0,016
Survivin im Kern	1/23 (4,3%)	9/34 (26,5%)	57	0,031

Tabelle 15: Korrelation von Aurora Kinase B und Survivin im Kern mit der Funktionalität

4.5.4 Grading

Es wurde eine inverse Beziehung zwischen der Expression von Aurora Kinase B im Kern und Zytosol festgestellt: G1-/G2-Tumore zeigen praktisch keine positive Reaktivität für Aurora Kinase B im Kern, während 50,0% der Kerne beim G3 NET und 85,7% beim G3 NEC positiv waren. Die zytosolische Expression dagegen war hoch in gut differenzierten G1- und G2-Tumoren, aber niedrig in wenig differenzierten G3 NECs.

Eine Korrelation mit Grading, folglich mit Ki-67 konnte außerdem für die nukleäre Expression von Survivin und FOXM1 statistisch signifikant nachgewiesen werden. Das heißt, je schlecht differenzierter der Tumor (G3 NEC) ist bzw. je höher der Proliferationsindex (Ki-67), desto eher zeigt sich immunhistochemisch eine nukleäre Expression. Die Expression von Aurora Kinase B, Survivin und FOXM1 im Kern zeigten in der univariaten Analyse eine signifikante Korrelation mit dem Grading.

	G1 NET	G2 NET	G3 NET	G3 NEC	Summe	p
Aurora B Zytosol	33/43 76,7%	14/23 60,9%	0/2 0,0%	1/7 14,3%	75	0,003
Aurora B Kern	2/43 4,7%	0/23 0,0%	1/2 50,0%	6/7 85,7%	75	0,000
Survivin Kern	0/43 0,0%	4/23 17,4%	2/2 100,0%	7/7 100,0%	75	0,000
IGF-1R	2/35 5,7%	3/20 15,0%	0/1 0,0%	2/4 50,0%	60	0,064
FOXM1	0/15 0,0%	2/8 25,0%	0/1 0,0%	3/6 50,0%	30	0,032
STAT3	2/30 6,7%	2/13 15,4%	0/2 0,0%	1/7 14,3%	52	0,546
pSTAT3	3/30 10,0%	2/13 15,4%	0/2 0,0%	1/7 14,3%	52	0,799

Tabelle 16: Übersicht der positiven Immunreaktivität aller Zielstrukturen, sowie die statistische Signifikanz, univariat

4.6 Multivariate Analyse

Proteine, bei denen in der univariaten Analyse des Gesamtüberlebens eine Signifikanz ($p < 0,05$) errechnet wurde, wurden in der multivariaten Analyse berücksichtigt. Die Cox-Regressionsanalyse wurde mit den klinisch-pathologischen Parametern wie Metastasenstatus und Tumorgrading als Kovariate durchgeführt. Das Hazard Ratio für Grading und nukleäre Reaktivität von Aurora Kinase B liegt knapp über 1 und ist daher ohne unabhängigen prognostischen Wert. Die multivariate Signifikanz-Analyse ergab somit, dass Aurora Kinase B im Kern kein unabhängiger Prognosefaktor ist. Das Hazard Ratio zeigt im Cox-Regressionsmodell ein >5-fach erhöhtes Sterberisiko für Patienten mit Metastasen (95% Konfidenzintervall, $p < 0,01$).

4.7 Expressionsverhalten und Korrelation mit Überleben

Diese Arbeit untersuchte auch den Einfluss der Proteinen auf die Überlebenschancen. Anschließend wurde die Abhängigkeit der in isolierten Analysen signifikanten Variablen auf das Gesamtüberleben untersucht. Das Patientenkollektiv wurde bezüglich der Überlebenszeit in zwei Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 umfasst Tumore mit positiver Expression von Aurora Kinase B im Kern und wurde mit Gruppe 2-Tumore ohne positive Expression von nukleärer Aurora Kinase B verglichen. Korreliert man die mittlere Überlebenszeit mit der nukleären Expression von Aurora B, so ist diese in der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse mit einer signifikant verkürzten Überlebensrate assoziiert (46,0 Monate, $N=9$) im Gegensatz zu Patienten, deren Tumor keine nukleäre Aurora Kinase B exprimiert (99,0 Monate, $N= 66$). Das relative Risiko für die Patienten am Tumor zu versterben, ist beim Nachweis nukleärer Aurora Kinase B um den Faktor 1,9 erhöht innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% beträgt die mittlere Überlebenszeit der Patienten ohne nukleäre Expression von Aurora Kinase B zwischen 89,6 - 108,5 Monaten, Patienten mit positiver Reaktivität im Kern dagegen 11,7 - 80,3 Monate ($p=0,006$). In der Überlebensanalyse im Log-Rank-Test (Mantel Cox) ist die positive Expression im Kern von Aurora Kinase B signifikant mit der Überlebenszeit assoziiert ($p=0,006$).

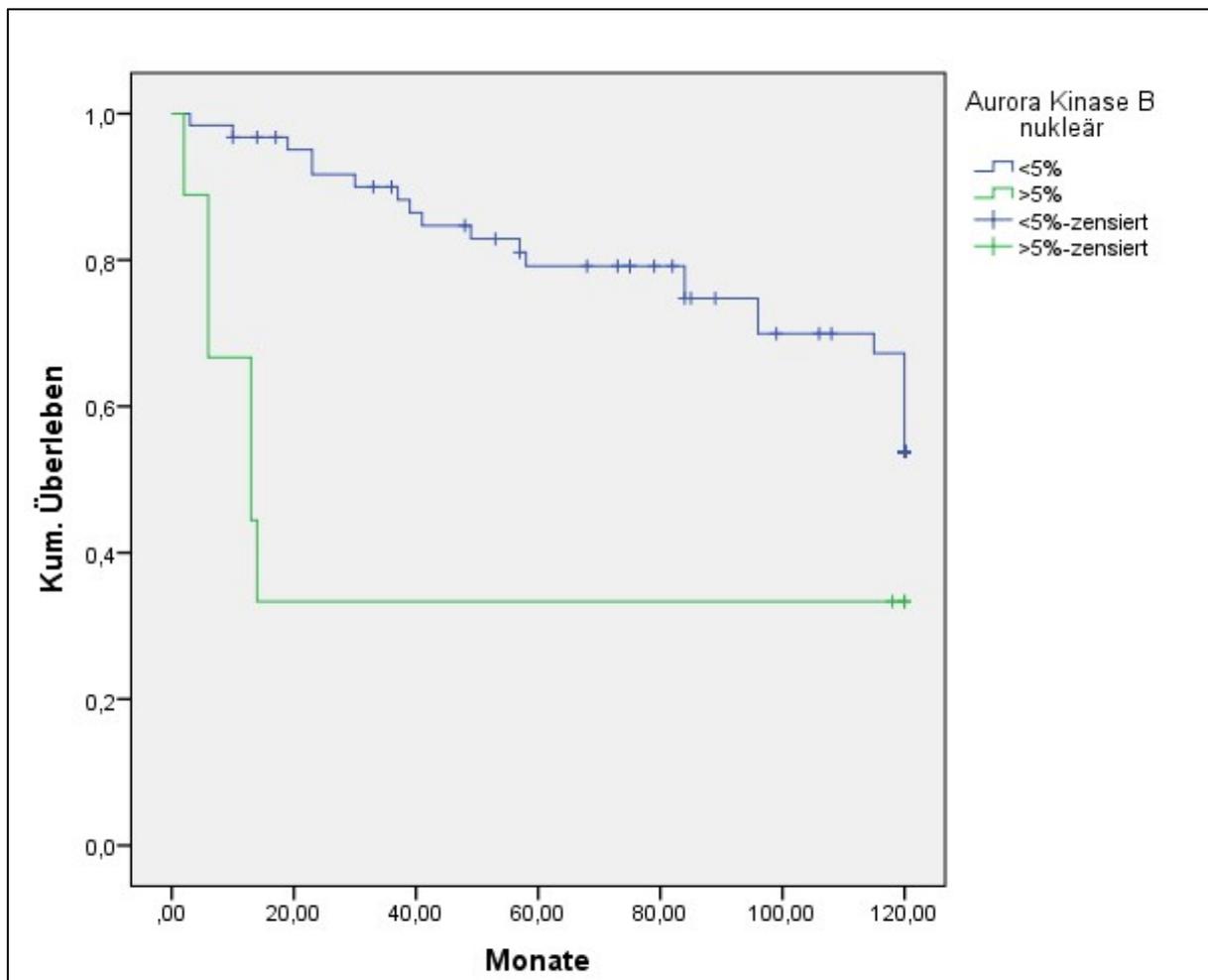


Diagramm 7: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der Expression von **Aurora Kinase B im Nukleus**, $p=0,006$.

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe mit und der Gruppe ohne zytosolische Aurora Kinase B Expression lag nicht vor ($p=0,812$, Log-Rank-Test).

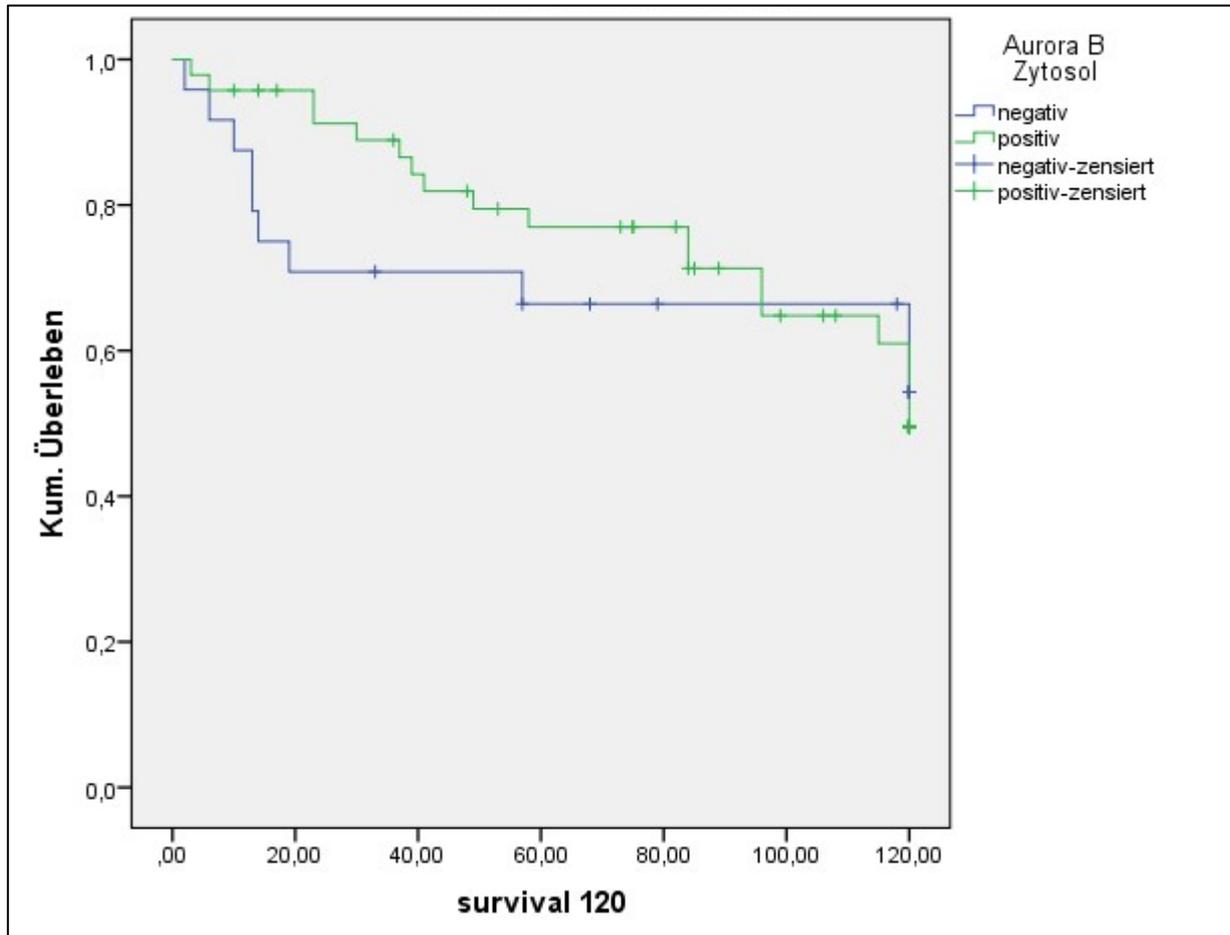


Diagramm 8: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der Expression von **Aurora Kinase B im Zytosol**, $p=0,812$.

Auch die nukleäre Expression von Survivin war mit einer deutlich kürzeren Überlebenszeit assoziiert. Die mittlere Überlebenszeit betrug 46,9 Monate bei positivem Nachweis von Survivin im Kern und 101,7 Monate bei negativer Expression (signifikant im Log-Rank-Test $p=0,000$).

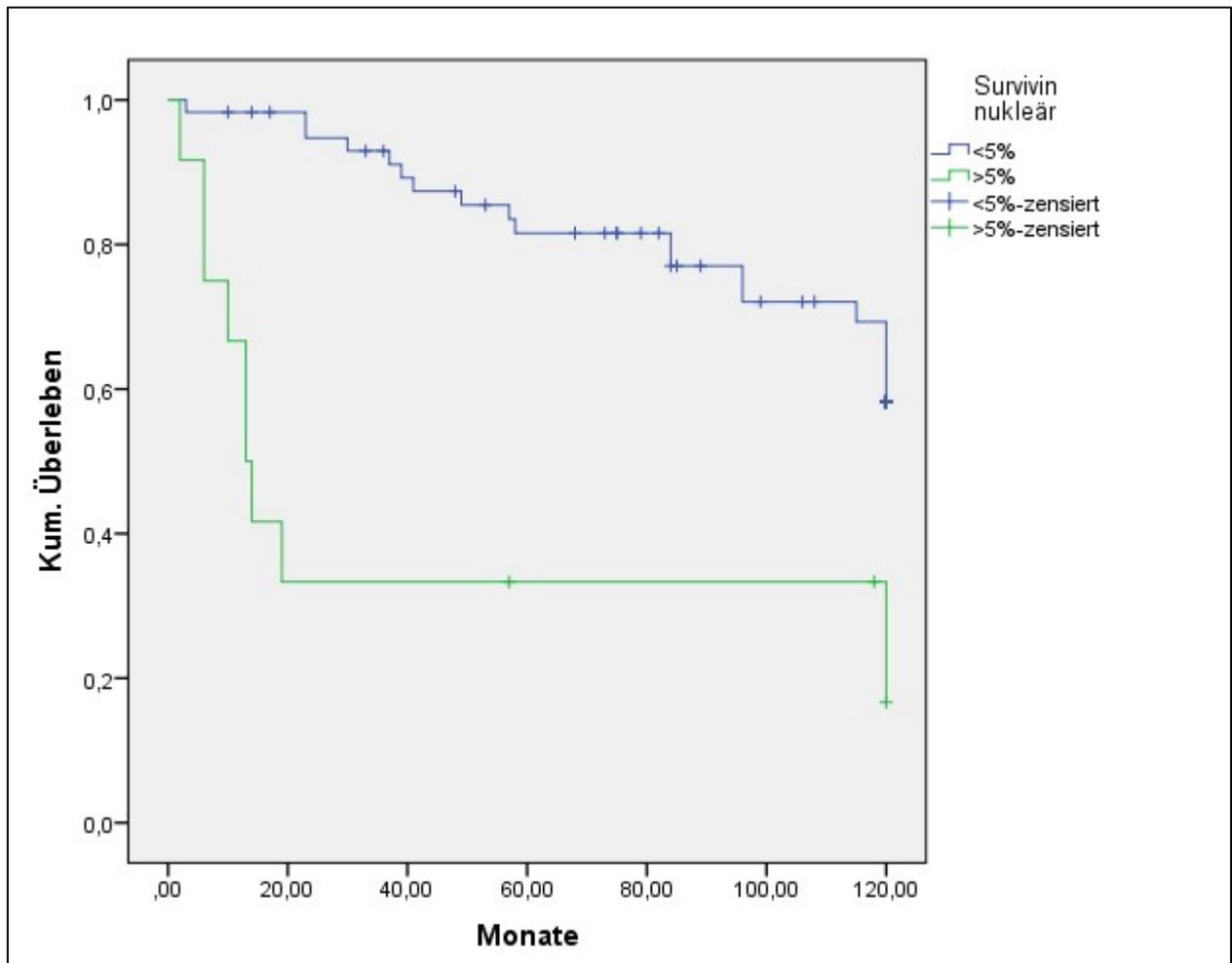


Diagramm 9: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von **Survivin im Nukleus**, $p=0,000$.

Die mittlere Überlebenszeit am Tumor zu sterben beträgt bei Expression von IGF-1R im Kollektiv um die 63,9 Monate, ohne Nachweis einer IGF-1R- Expression 98,2 Monate. Es findet sich ein signifikanter Unterschied beider Gruppen ($p=0,021$, Log-Rank-Test).

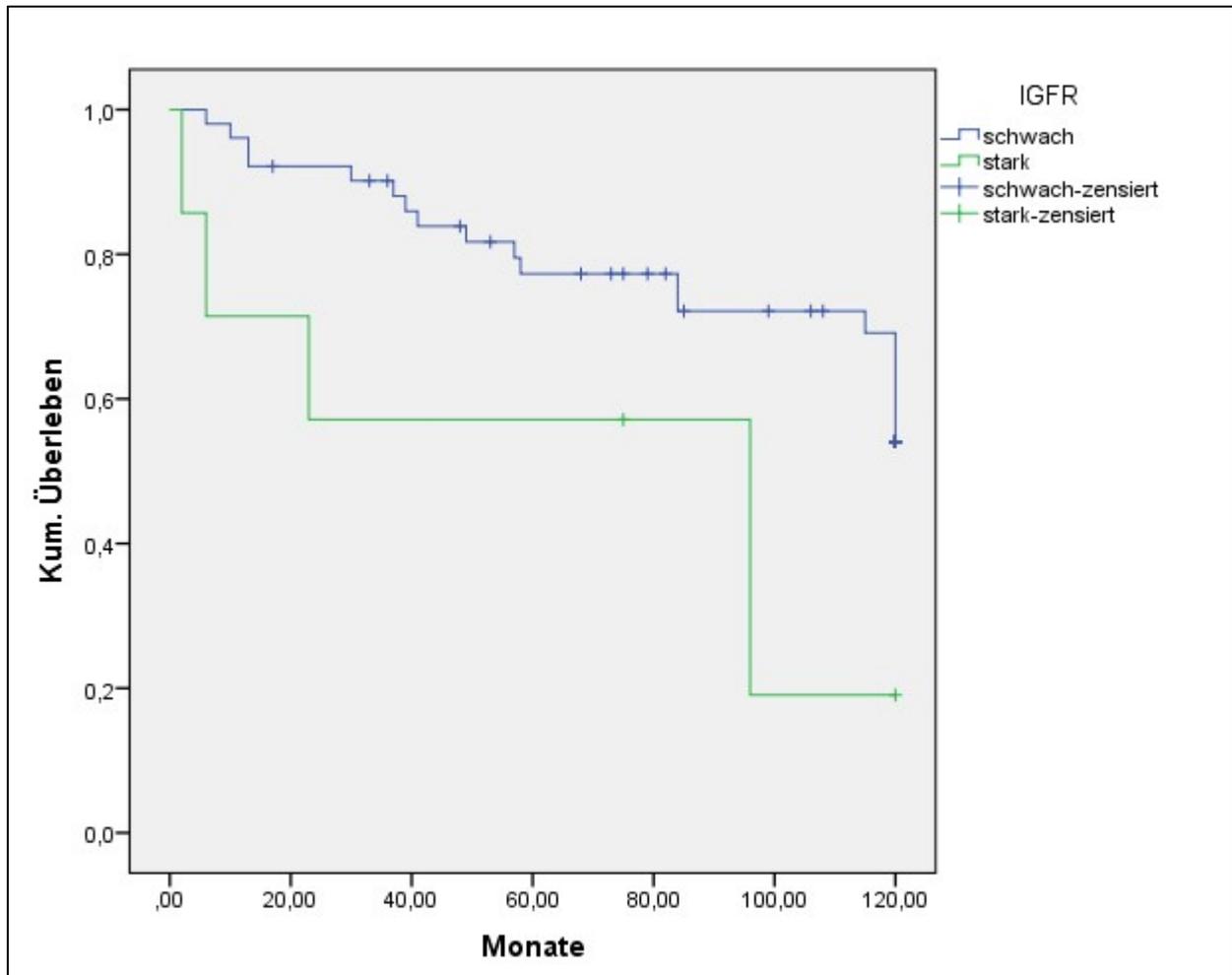


Diagramm 10: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von **IGF-1R-Expression**, $p=0,021$.

Die Expression von STAT3, pSTAT3 und FOXM1 zeigte hinsichtlich der Korrelation mit dem Überleben keine Signifikanz.

4.8 Individuelle Krankheitsverläufe bei G3 NECs

Das Kollektiv umfasst insgesamt 9 Patienten mit einem G3-Tumor, davon jeweils 2 G3 NET und 7 G3 NEC (siehe Tabelle 17). Wegen der kleinen Fallzahl und der damit verbundenen Einschränkung einer statistischen Aussage wird eine Betrachtung und Beschreibung der individuellen Krankheitsverläufe im Zusammenhang mit dem Expressionsverhalten der untersuchten Proteine vorgenommen. Wir haben uns dabei besonders für den klinischen Verlauf der Patienten aus der G3 NEC-Subgruppe interessiert und haben gleichzeitig deren individuellen Krankheitsverlauf (Zeit bis zum Tumortod) angeschaut: 50% der G3 NEC Patienten (Pat. 7, 8 und 9) im Kollektiv zeigten eine positive FOXM1-Immunreaktivität. 4 weitere Patienten (Pat. 2, 3, 4 und 6) mit einem hohen Ki-67-Index zeigten in der immunhistochemischen Untersuchung eine negative bzw. niedrige FOXM1-Immunreaktivität. Alle Patienten zeigten eine positive Survivin-Expression im Kern. Patienten mit nukleärer Immunreaktivität für Aurora Kinase B und Survivin hatten eine kurze Überlebenszeit. Dabei tanzt Patient 5 "aus der Reihe". Patient 1 ist Aurora Kinase B negativ, zeigt aber ebenfalls eine kurze Überlebensdauer, weist histologisch aber als einziger eine positive Lymphozyteninfiltration auf. Die Tumore von Patient 6 und Patient 9 zeigten eine Reaktivität für IGF-1R und gleichzeitig eine mäßige Immunreaktivität für STAT3.

Pat.-Nr. G3	Ki-67 in %	Überleben in Monaten	Tumor - tod?	Aurora B nukleär	Survivin nukleär	FOXM 1	IGF-1R	STAT3
1 NET	45%	19	ja	negativ	positiv	n.a.	positiv	negativ *
2 NET	45%	13	ja	positiv	positiv	negativ od. niedrig	n.a.	negativ
3 NEC	70%	57	lebt	negativ	positiv	negativ od. niedrig	n.a.	niedrig
4 NEC	80%	6	ja	positiv	positiv	negativ od. niedrig	n.a.	niedrig
5 NEC	60%	118	andere Todesursache	positiv	positiv	n.a.	n.a.	niedrig
6 NEC	70-80%	2	ja	positiv	positiv	negativ od. niedrig	positiv	mäßig
7 NEC	70%	13	ja	positiv	positiv	positiv	negativ	negativ
8 NEC	70%	14	ja	positiv	positiv	positiv	negativ	niedrig
9 NEC	80%	6	ja	positiv	positiv	positiv	positiv	mäßig

Tabelle 17: Auflistung aller Patienten mit G3 NET und G3 NEC (* STAT3 aber positiv in Lymphozyten)

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit mit 75 Patienten untersuchten wir beim GEP-NET in allen Grading-Gruppen das Expressionsverhalten der dem *chromosomal passenger complex* gehörende Proteine Aurora Kinase B, Survivin, sowie deren übergeordneten Regulator FOXM1 und die weiteren Faktoren des Signalweges IGF-1R und STAT3/pSTAT3. Da klinisch innerhalb der Grading-Gruppen sehr oft heterogene Krankheitsbilder und Verläufe beobachtet wurden, halten wir eine genaue Charakterisierung der proliferationsrelevanten Proteine innerhalb der biologischen Variationsbreite zum Verständnis der zugrunde liegende Signalwege für sehr wichtig und postulieren das Konzept der Subgruppen innerhalb der aktuell existierenden Grading-Gruppen. Die zugrunde liegenden Mechanismen, die das Tumorverhalten beeinflussen, sind bisher weitestgehend unbekannt. So hat sich als bislang einzig prognostisch etablierter Marker nur Ki-67 durchgesetzt. Ki-67 als Unterscheidungsmarker ist nicht scharf genug getrennt. Es existiert kein cut-off-Wert, der beispielsweise G3 NET von G3 NEC unterscheidet. G3-Tumore sind selten, sie machen nur etwa 5% aller neuroendokrinen Neoplasien aus (Rinke und Gress 2017). Die seltene Inzidenz macht jede Interpretation statistisch schwierig und es existieren nur wenig Daten. So konnte in einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe für die Ki-67- Expression beim "WDEC" (damals WHO 2) keine prognostisch signifikante Relevanz festgestellt werden. Dies konnte der kleinen Fallzahl von damals verschuldet sein (Grabowski et al. 2005). Ki-67 als Ausdruck der Proliferationsrate und Differenzierungsgrad ist in dieser Arbeit entsprechend der WHO-Empfehlung aus dem Jahr 2010 in G1 (Ki-67 \leq 2%), G2 (Ki-67 = 3-20%) und G3 (Ki-67 $>$ 20%) unterteilt. In der Nordic-Studie konnte beim G3 NET mit Ki-67 $<$ 55% eine längere Überlebenszeit als diejenigen mit einem Ki-67 $>$ 55% gezeigt werden. Zudem wurde in der G3-Gruppe eine bessere Ansprechbarkeit auf Platin-basierte Chemotherapeutika bei Tumoren mit einem Ki67 $>$ 55% festgestellt (Sorbye 2013). Hinsichtlich der Überlebenszeit unterscheidet sich G3 NET von G3 NEC mit 99 Monate versus 17 Monate (Heetfeld et al. 2015). Auch in molekulargenetischen Untersuchungen lassen sich Unterschiede G3 NET von NEC unterscheiden. Eine DAXX/ATRX-Mutation zeigt sich beispielsweise in ca. der Hälfte der pankreatischen G3 NET, nicht aber beim G3 NEC. Hier sind p53/rb1 Mutationen kennzeichnend (Jiao et al. 2011).

Ziel dieser Arbeit ist eben die Charakterisierung des Expressionsverhaltens und die Evaluation der klinischen Relevanz von Mitose-assoziierten Kinasen des Chromosomal Passenger Komplexes Aurora Kinase B und Survivin, die potenziell für eine maligne

Transformation der GEP-NENs verantwortlich sein können. FOXM1 wurde als Regulator der STAT3-Aktivierung, beispielsweise beim Glioblastom beschrieben. Demnach steigert FOXM1 die STAT3-Expression durch die Verstärkung der β -catenin/TCF4- Bindung zum Promotor des STAT3-Gens (Gong et al. 2015). In der Literatur wurde zudem dem Tyrosin Kinase- Rezeptor IGF-1R eine wichtige Rolle in der Tumorgenese bei gastroenteropankreatischen Tumoren zugeschrieben (Briest und Grabowski 2014). Wir fanden es daher sinnvoll, im Rahmen der immunhistochemischen Charakterisierung neben Aurora Kinase B und Survivin, auch die Co-Regulatoren wie FOXM1, STAT3 und IGF-1R in GEP-NENs zu untersuchen. Erstmals wurden nun im Rahmen dieser Arbeit bei GEP-NENs der Expressionsstatus der Mitglieder des Chromosomal Passenger Complexes, sowie deren Co-Regulatoren nebeneinander untersucht und deren Beziehungen zueinander analysiert. In Zusammenarbeit mit zwei weiteren Zentren in Marburg und Freiburg konnte Tumormaterial von 75 Patienten mit vollständigem 5-Jahres Follow-up und somit ein Patientenkollektiv mit - für diese Tumorentität - recht hoher Fallzahl aufgestellt werden.

Die Mitglieder des Chromosomal Passenger Complexes Aurora Kinase B und Survivin sind bereits gut erforscht. So wurde Aurora Kinase B als ein wichtiges Protoonkogen beschrieben und deren Anwesenheit bei vielen soliden Tumoren nachgewiesen (Mehra et al. 2013, Han et al. 2017, Huang et al. 2015, Pannone et al. 2011). Bisher haben nur wenige Arbeiten die Bedeutung von Aurora Kinase B in GEP-NENs untersucht. Konkret existiert für Aurora B derzeit keine Untersuchung, die deren Expressionsverhalten im Zusammenhang mit Grading und prognostischer Relevanz bei GEP-NEN beschreibt.

5.1 Beurteilung der Methodik und Auswertung

Die Menge der Tumormaterialien, die für eine gepaarte Untersuchung zur Verfügung standen waren begrenzt: In anderen Fällen waren aufgrund der Tumorgroße/Biopsatgröße nicht genügend Materialien für die umfangreichen Färbungen vorhanden. Die Auswertung am Mikroskop erfolgte durch 2 Untersucher zunächst unabhängig voneinander. Die Beurteilung der Farbintensität ist bis zu einem gewissen Grad durch die subjektive Einschätzung beeinflusst. Um diesen Grad an Subjektivität so klein wie möglich zu halten, wurde in dieser Arbeit darauf geachtet, dass sämtliche Scoring-Systeme so einfach und klar wie möglich, aber so differenziert wie nötig gehalten

werden. So wurde bewusst auf eine zu differenzierte Intensitätseinteilung mit geringer Trennschärfe verzichtet und vornehmlich die klare Einteilung in negativer und positiver Immunität mit schwacher, moderater und kräftiger Expression vorgenommen.

Die postulierte Ergänzung der Markerproteine in der histopathologischen Routineuntersuchung wurde retrospektiv in weiteren und unabhängigen Kollektiven, sowie prospektiv untersucht.

Qualität einer immunhistochemischen Färbung: Die Immunhistochemie beansprucht Zeit und ist fehleranfällig. Die Qualität einer Färbung ist abhängig von der Einbettungsart und Vorbehandlung der Schnitte. Wenn die Präparate durch Formalin bzw. mit Paraffin gebettet wurden, dann können die Antigene nicht mehr vom Antikörper erkannt werden. Um die Immunaktivität wieder herzustellen, müssen die Gewebsschnitte vorbehandelt werden. Durch Hitzebehandlungen oder mithilfe von Enzymen kann die Antigenmaskierung rückgängig gemacht und die Immunreaktivität wieder hergestellt werden. Die Antikörper-Antigenreaktion ist außerdem abhängig von Temperatur, Reaktionsmilieu, Konzentration der Antikörper, sowie Inkubationszeit der Schnitte mit dem Antikörper. Zum Zeitpunkt der immunhistochemischen Färbung von Aurora Kinase B existierte kein standardisiertes Färbeprotokoll für GEP-NENs. Das Tumorgewebe wurde mit modifizierten Protokollen anderer Tumorentitäten und verschiedenen Antikörpern gegen Aurora B behandelt bis ein zufriedenstellendes Färbeergebnis erreicht werden konnte. Um eine Vergleichbarkeit der Färbungen herzustellen, wurden Gewebeproben anderer Tumorentitäten mit einer bekannten Immunreaktivität für das gesuchte Antigen bei jedem Färbegang mitbehandelt. Diese zeitgleich mitlaufende Vergleichsgruppe dient als Kontrollgruppe der Aussagekräftigkeit und soll die Qualität der durchgeführten Färbungen bestätigen. Neben Kosten- und Zeitfaktor war auch die unterschiedliche Qualität der Antikörper von Nachteil. Von Vorteil ist, dass die Immunhistochemie eine Protein-spezifische Analyse, eine Gewebespezifische und eine Zellfraktionsspezifische Analyse erlaubt. Des Weiteren ist eine Analyse an FFPE-Materialien möglich. Die Untersuchung von durch Formalin und mit Paraffin eingebetteten Geweben ist somit auch nach langer Zeit noch möglich. Zudem ist die Methode leicht verfügbar und durchführbar und eignet sich für die Routinediagnostik in ihrer Praktikierbarkeit.

5.2. Interpretation der Ergebnisse

Aurora Kinase B: Die immunhistochemische Untersuchung dieser Arbeit erbrachte den Nachweis von Aurora Kinase B in verschiedenen Zellkompartimenten bei GEP-NEN-Tumoren. Durch den immunhistochemischen Nachweis von Aurora Kinase B im Kern bzw. im Zytoplasma ließen die G1 und G2 NENs sich von G3 NENs abgrenzen. Wir konnten mit dieser Arbeit zeigen, dass Aurora Kinase B in G1- und G2-Tumoren vor allem im Zytoplasma lokalisiert ist. Es könnte sein, dass Aurora Kinase B bei G1- und G2-Tumoren aus dem Kern heraus transportiert wurde und dabei inaktiv bleibt oder sie wird nicht im aktiven Zustand in den Kern transportiert, also ein Mechanismus über einen nukleozytoplasmatischen Transporter, der ähnlich wie beim Survivin als "shuttling" vorbeschrieben wurde (Rodrigues et al. 2006). In der Überlebensanalyse war das Vorhandensein von Aurora Kinase B im Kern mit einer deutlich kürzeren Überlebenszeit verbunden als mit Ki-67 allein. Die vorliegenden Daten stützen die Vermutung, dass Aurora Kinase B im Sinne eines Tumorprogresses in niedrig differenzierten Tumoren aktiv bzw. hochreguliert wird. Diese Ergebnisse stützen zudem die Beobachtung, dass hochmaligne NECs funktionell inaktiv sind (Adil et al. 2015). Fraedrich *et al.* haben in 2012 in einer Kooperationsarbeit die Wirksamkeit des Pan-Aurora-Inhibitors Danuserib beschrieben. Der Einsatz von Daunuserib führte hier in gut differenzierten GEP-NEN-Zelllinien (BON und QGP) *in vitro* zu einem Proliferationsstopp. Am Xenograft-Model führte Danuserib zu einer Reduktion der Tumorgroße und einer Senkung des Serum-Spiegels von Chromogranin A bei Mäusen *in vivo*. In deren immunhistochemischer Untersuchung wurden vor allem G1- und G2- Tumore auf die Expression von Aurora Kinase B untersucht. Nur ein G3- Tumor wurde von insgesamt 43 GEP-NETs eingeschlossen und dieser war nukleär Aurora Kinase B positiv (Fraedrich et al. 2012). Die vorliegende Arbeit schloss 9 G3-Tumore ein, davon 7 NECs und 2 NETs. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition von Aurora Kinase B vor allem bei G3-Tumoren effektiver sein könnte als in gut differenzierten pankreatischen GEP-NET Zelllinien. In GEP-NENs konnte eine hohe Expression von Aurora Kinase B vor allem in den schlecht differenzierten Tumoren mit prognostisch ungünstigem Verlauf festgestellt werden. Darauf aufbauend wurde bereits die Wirkung des Aurora Kinase B Inhibitors ZM447439 auf Tumorwachstum und Apoptose in den GEP-NEN Zelllinien BON, QGP-1 und zusätzlich in der schlechten differenzierten Zelllinie MIP-101 untersucht. Die Inhibition von Aurora Kinase B führte zu einem Proliferationsstopp aller drei Zelllinien und leitete die Apoptose ein. Der kombinierte

Einsatz mit Streptozozin und Cisplatin steigerte zudem den antiproliferativen Effekt des Inhibitors (Georgieva et al. 2010). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind vielversprechend, um Aurora Kinase B als Target für neue therapeutische Ansätze in GEP-NEN zu definieren. Ob die nukleäre Expression insbesondere für die seltenen NEC G3 einen prädiktiven Wert haben in Bezug auf diese pharmakologische Intervention, muss abgewartet werden. Dies könnte aufgrund der vorliegenden Untersuchung zu erwarten sein und sollte in weiteren Studien berücksichtigt werden. Ein entsprechend kommerziell verfügbares Zelllinienmodell der NET G3 Tumore existiert bislang nicht. Es werden aber Zelllinien etabliert, die den klinisch relevanten NET G3/NEC G3 entsprechen (J. Schrader, unveröffentlichte Daten), so dass es in Zukunft möglich sein sollte, die Effekte von Aurora Kinase Inhibitoren in vivo zu testen, wofür diese Ergebnisse die Grundlage bilden können. Vischioni *et al.* untersuchten das Expressionsverhalten von Aurora Kinase B bei Nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen. Die Expression zeigte eine starke Korrelation mit der nukleären Expression von SURVIVIN. Eine Überexpression von Aurora Kinase B im Kern gingen - wie auch mit der vorliegenden Arbeit übereinstimmend - mit einer kurzen Überlebenszeit einher (Vischioni et al. 2006). Auch für Prostatakarzinome wurden ähnliche Ergebnisse gefunden: Die nukleäre Expression von Aurora Kinase B korreliert mit den Gleason Score und Tumorprogress (Chieffi et al. 2006). Eine weitere Beobachtung der Arbeit ist, dass die AURORA KINASE Inhibition eine Tumorkontrolle herbeiführt, jedoch nicht mit gesunden Epithelzellen der Prostata interferiert.

Survivin: Die vorliegende Arbeit stellt für die Expression von Survivin ein ähnliches Verteilungsmuster wie bei Aurora Kinase B fest. Patienten, bei denen die Tumore nukleäres Survivin aufweisen, hatten eine kürzere Überlebenszeit gegenüber Patienten mit Tumoren, die kein nukleäres Survivin zeigen (Grabowski et al. 2005). In gut differenzierten G1-Tumoren wurden keine oder nur eine geringe zytoplasmatische Expression nachgewiesen. Bei hoher Aurora B-Expression im Zytoplasma liegt gleichzeitig eine niedrige Survivin-Expression im Kern vor. Survivin und seine prognostische Bedeutung wurde bereits bei einer anderen gastrointestinalen Tumorentität (Ösophaguskarzinom) nachgewiesen (Grabowski et al. 2003). Weiterhin wurde die prognostische Bedeutung des nukleären Survivins beim damals noch als PDEC (WHO III) klassifizierten GEP-NEN verdeutlicht (Grabowski et al. 2005). Im nun vorliegenden der aktuellen Klassifikation angepassten Kollektiv kann die Rolle des nukleären Survivins beim schlecht differenzierten G3 GEP-NEC erneut belegt werden.

Zudem können G2 NENs mit nukleärer Survivin-Expression im Kern und schlechtem Krankheitsverlauf deutlich von solchen ohne Survivin-Expression und besserem Krankheitsverlauf abgegrenzt werden. Die mäßig differenzierten G2 NENs sind bisher am wenigsten gut definiert. So könnte Survivin in dieser Gruppe als prognostisch relevanter Marker implementiert werden. Basierend auf dieser Hypothese wurde bereits in einer kleineren Fallzahl Blutproben von Patienten mit einer GEP-NEN auf Survivin prä- und postoperativ gesammelt und dazu die klinischen Verlaufsdaten ausgewertet. Demnach weisen Patienten mit einem GEP-NEN einen erhöhten Serum Survivin-Spiegel auf als gesunde Probanden (noch unveröffentlichte Daten). Auch therapeutisch bleibt Survivin Gegenstand interessanter Therapieansätze: In einem interessanten Untersuchungsansatz von Kim *et al.* wurde der Effekt einer synergistischen Inhibition von Survivin und Aurora Kinase B beim Mesothelialkarzinom untersucht (Kim et al. 2007). Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass die duale Hemmung die Tumorzellen gegenüber einer Radiatio sensibilisieren. Da G3 NECs im Kern sowohl Aurora Kinase B als auch Survivin exprimieren, könnte eine synergistische Inhibition auch bei GEP-NENs ein interessanter Ansatzpunkt sein. Mit dem Survivin-Inhibitor YM-155 konnte *in vitro* den apoptotischen Zelltod nachgewiesen und im Xenograftmodell konnte das Wachstum von GEP-NEC gehemmt werden (Dizdar et al. 2017). Shi et al. zeigten ebenfalls, dass der Survivin-Inhibitor *in vivo* Tumorwachstum beim Nasopharyngealen Karzinom in Dosisabhängigkeit hemmt (Shi et al. 2020).

IGF-1R: Höpfner et al zeigten 2006 erstmalig, dass der IGF-1R-Tyrosin-Kinase-Inhibitor NVP-AEW541 in der GEP NET- BON-Zelllinie Apoptose und Zellarrest in neuroendokrinen Tumorzellen induzieren kann (Höpfner et al. 2006). Die Hemmung von HSP90 (heat shock protein 90) mittels des Inhibitors IPI-504 führt zu einer Abnahme im IGF-1R Level und löst in CM (Insulinom)- und BON (Pankreas)-NET-Zelllinien Apoptose und Zellzyklus-Arrest aus (Gloesenkamp et al. 2012). Anders als die Ergebnisse der Zelllinien vermuten lassen, war IGF-1R in der immunohistochemischen Untersuchung in unserem Patientenkollektiv weder in gut differenzierten, noch in schlecht differenzierten GEP-NENs in signifikanter Weise überexprimiert. Mutmaßlich ist das vielleicht der Grund, dass sich bisher kein IGF-1R-Inhibitor in der Therapie durchsetzen konnte. Schaut man sich aber die Beziehung zwischen Expression und Metastasen-Status in diesem Kollektiv an, so stehen beide in signifikanter Korrelation zueinander. In einer Arbeit von Gryko *et al.* wurde eine positive Assoziation zwischen dem immunohistochemischen Nachweis von IGF-1R und dem Vorhandensein von

Lymphknoten-Metastasen beim Magenkrebs festgestellt (Gryko et al. 2014). Auch in unserem Kollektiv war der Metastasen-Status mit membranöser IGF-1R-Expression assoziiert. Ein weiterer interessanter Aspekt beim IGF-1R ist dessen Rolle in der Tumorfunktionalität: Untersuchungen an gut differenzierten GEP-NEN-Zelllinien haben einen Zusammenhang zwischen IGF-1R und Hypersekretion von biogenen Aminen festgestellt (von Wichert et al. 2000 und Münzberg et al. 2015). Die vorliegende retrospektive Untersuchung an Tumorparaffinschnitten konnte keine signifikante Korrelation zwischen der IGF-1R-Expression und der Funktionalität nachweisen. Der "Verlust" der Funktionalität ist vor allem ein Charakteristikum, welches für schlecht differenzierte GEP-NECs typisch ist und wäre möglicherweise in schlecht differenzierten Zelllinien anders ausgefallen. Allerdings zeigt sich in diesem Kollektiv, anders als die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Wichert, dass auch die gut differenzierten GEP-NENs immunohistochemisch keine Überexpression von IGF-1R haben. Die sogenannten „gut differenzierten“ Zelllinien BON, QGP-1, inzwischen charakterisiert, weisen diverse Mutationen inklusive im p53 Gen auf und entsprechen somit nicht den klinischen gut differenzierten GEP-NEN, die in aller Regel nicht p53 mutiert sind (Vandamme et al. 2015). Ein möglicher Ansatz heutzutage wäre der Vergleich mit der nun verfügbaren gut differenzierten Neuroendokrinen Tumorzelllinie NT-3, die deutlich mehr einer G1/G2 NET Zelllinie entspricht (Benten et al. 2018). Eine Überexpression von IGF-1R wurde auch bei metastasierten kolorektalen Karzinomen festgestellt (Hakam et al. 1999). Bei einer weiteren Untersuchung von Mammakarzinomen fand sich jedoch keine Korrelation zwischen IGF-1R Überexpression und Prognose oder anderen klinisch-pathologischen Parametern (Shimizu et al. 2004). Auch neuroendokrine Tumore überexprimieren IGF-1 und den dazugehörigen Rezeptor. Die Arbeitsgruppe um von Wichert zeigten außerdem, dass IGF-1 die Sekretion von Chromogranin A steigert. Die IGF-1 Rezeptor-Tyrosinkinase stimuliert offenbar die Sekretion und wurde als Mediator für das Hypersekretionssyndrom, also die Funktionalität einer neuroendokrinen Tumorerkrankung postuliert (von Wichert et al. 2000). In einer Multicenter-Studie, bei der Patienten mit einem fortgeschrittenen Pankreas-NET mit dem IGF-1R-Antikörper Ganitumab behandelt wurden, konnte jedoch keinen signifikanten Effekt im Überleben nachgewiesen werden (Strosberg et al. 2013). Der IGF-1R-Expressionsstatus im Tumorgewebe der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten wurde von den Kollegen jedoch nicht untersucht. Eine „Selektion“ der Patienten mittels immunohistochemischer Untersuchung auf IGF-1R-

Expression vor Beginn der Therapie hätte womöglich ein anderes Ergebnis bezüglich des Ansprechens erbracht (Libutti 2013). In einer Arbeit von Vaira *et al.* führte die Stimulation im IGF-1-/mTOR-Signalweg zu einer gesteigerten Expression von Survivin in Tumorzellen der Prostata (Vaira *et al.* 2007). Wir konnten für GEP-NENs mittels Immunhistochemie aber keine Korrelation zwischen der Expression von IGF-1R und SURVIVIN feststellen. Das heißt, andere Signaltransduktionsmechanismen könnten eine Rolle spielen.

FOXM1: Als übergeordneten Regulator von Survivin und Aurora Kinase B wurde auch das Expressionsmuster von FOXM1 untersucht. Die immunhistochemische Untersuchung konnte zeigen, dass FOXM1 von G2- und vor allem G3-Tumoren exprimiert wird. G1 NENs exprimieren kein FOXM1 und konnten so von G2 und G3 NENs abgegrenzt werden. FOXM1 wurde wie Aurora Kinase B und Survivin bei schlecht differenzierten Tumoren verstärkt exprimiert und korreliert außerdem mit der Tumorgroße. Als alleiniger Marker ist die Expression von FOXM1 prognostisch nicht signifikant. Es könnte als Transkriptionsfaktor die verstärkte Expression von Aurora Kinase B und Survivin regulieren. Die Beziehung zwischen der Expression von Aurora B und FOXM1 wurde von Huang *et al.* bei Patienten mit einem Nasopharyngealkarzinom, die mit Radio-Chemotherapie behandelt wurden, untersucht. Der Nachweis einer Aurora B- und einer FOXM1-Überexpression ist hiernach mit einer schlechten Prognose verbunden. In der Korrelationsanalyse zeigten beide aber keine signifikante Assoziation zueinander (Huang *et al.* 2015). In unserem Kollektiv mit GEP-NEN-Patienten dagegen zeigte die positive Expression von Aurora Kinase B und FOXM1 einen signifikanten Zusammenhang und sind jeweils mit einem kürzeren Gesamtüberleben verbunden. Auch die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine hohe Expression von FOXM1 in GEP-NETs mit einer hohen Expression von Aurora Kinase B und Survivin im Kern vergesellschaftet ist. Deren Co-Existenz geht mit einer schlechten Differenzierung und mit Vorliegen von Metastasen einher. Wir haben bereits in einem anderen Projekt mittels Siomycin A, einem FOXM1 Inhibitor, den proapoptotischen Effekt in GEP-NEN Zelllinien nachgewiesen (Briest *et al.* 2015). FOXM1 reguliert als Transkriptionsfaktor Survivin und Aurora Kinase B (Wang *et al.* 2005). Diesen Zusammenhang ist auch bei anderen Tumorentitäten nachgewiesen worden (Bellelli *et al.* 2012, Nestal de Moraes *et al.* 2015).

STAT3: Die Literatur spricht STAT3 eine wichtige Rolle in vielen pathophysiologischen Prozessen zu, beispielsweise Tumordifferenzierung oder prognostische Bedeutung wie

das Gesamtüberleben (Wang et al. 2012, Yeh et al. 2013, Kamran et al. 2013). STAT3 wurde in diversen Untersuchungen als Malignitätsmarker in der Tumorgenese und im Tumorprogress beschrieben. Sowohl STAT3, als auch die aktivierte Form pSTAT3 zeigten in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zum Differenzierungsgrad beim GEP-NET. GEP-NEN-Tumore aus dem vorliegenden Kollektiv exprimieren kaum STAT3/pSTAT. Das Vorhandensein von STAT3/pSTAT3 hat nach Ergebnissen der statistischen Auswertung auch keine prognostische Bedeutung. In einer vorausgegangenen Arbeit wurde bereits postuliert, dass FOXM1 unter transkriptioneller Kontrolle von STAT3 steht (Briest et al. 2015). In der vorliegenden erweiterten Analyse konnte zwischen STAT3- Expression und Aurora Kinase B keine Korrelation gezeigt werden. Ebenso besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen Survivin- und STAT3-Expression. Wir haben auch das Expressionsverhalten der aktivierten Form phospho-STAT3 untersucht. Hier zeigten die Analysen ebenfalls keine signifikante Korrelation. Dies kann der kleinen Fallzahl geschuldet sein. STAT3 war bei einem der 9 G3-Tumoren positiv. Hier sollten Untersuchungen mit einem vergrößerten Kollektiv folgen.

5.3 Klinische Relevanz

Die GEP-NENs gehören zu den seltenen Tumorentitäten im Gastrointestinaltrakt. Durch bessere bildgebende Verfahren können sie heutzutage früher und häufiger diagnostiziert werden. Trotz einiger Fortschritte sind nach wie vor die theurapeutischen Optionen begrenzt. In der Tumorthherapie spielen Biomarker als Prognosefaktoren oder als Tool zur Beurteilung der Behandlungseffektivität eine immer größere Rolle. Für diverse Tumorentitäten existieren im Rahmen der Routinediagnostik bereits gut etablierte prädiktive Biomarker, wie beispielsweise der MGMT-Methylierungsstatus beim Glioblastom (Hegi et al. 2005). Für GEP-NEN fehlt ein solcher Marker. Vor allem der Krankheitsverlauf der G2-Tumorgruppen ist heterogen und nicht berechenbar. Auch innerhalb der G3-Gruppe können sich die Krankheitsverläufe sehr voneinander unterscheiden. Die Unterscheidung einer Subgruppe in NEC G3 und NET G3 wird zwar propagiert, die Signalwege, die solch ein heterogenes Tumorverhalten bzw. maligne Transformation hervorrufen, sind weitestgehend noch nicht erforscht. Die Fallzahl der seltenen G3 NEC-Tumore in unserem Kollektiv ist klein. Die Besonderheiten in dieser Grading-Gruppe haben wir daher individuell und gesondert betrachtet. Alle dieser

Tumore exprimierten im Kern Survivin. Wir finden in dieser Gruppe außerdem ganz klar zwei Patienten, die nicht den anderen NECs entsprechen und als einzige Aurora Kinase B negativ waren. Interessanterweise zeigte bei einem Patient eine Lymphozyteninfiltration mit positiver STAT3 Reaktivität. Dies erlaubt zwar insgesamt keine Unterstellung von Kausalitätszusammenhängen, könnte aber ein interessanter Ansatz sein für weitere Überlegungen. In der vorliegenden Arbeit wurde im Kollektiv das Expressionsverhalten von Mitose-relevanten Kinasen bei den GEP-NENs aller Grading-Gruppen untersucht. Detektiert wurden mögliche Mediatoren, die eine maligne Transformation herbeiführen können. Da FOXM1 die Aktivität von Aurora Kinase B, Ki-67 und Survivin auf Transkriptionsebene reguliert, kann ein Zusammenhang im Expressionsverhalten vermutet werden. In vorausgegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde bereits die prognostisch relevante Bedeutung von FOXM1 nachgewiesen (Briest et al. 2015): Diesen Zusammenhang sehen wir, verdeutlicht durch die Ergebnisse dieser Arbeit, auch in Anwesenheit von nukleärer Aurora Kinase B- Expression. Aufgrund deren Rolle in der Tumorgenese erscheint uns Aurora Kinase B als ein vielversprechendes Angriffsziel in der Tumorbehandlung. Die Ergebnisse über das Expressionsverhalten der Proteine und deren Relation zueinander in dieser Arbeit deuten daraufhin, dass FOXM1 in gleicherweise Aurora B transkriptionell reguliert wie SURVIVIN und STAT3. Daraus resultiert die Überlegung, dass eine Inhibition von FOXM1 auch die Downregulation nachfolgender Protein-Kinasen, inklusive die des Chromosomal Passenger Komplexes herbeiführen könnte. Pharmakotherapeutisch wäre dieser Angriffspunkt ein interessanter Ansatz als Alternative zur selektiven Inhibition einzelner Kinasen. Die nukleäre Expression von Aurora Kinase B und Survivin, sowie FOXM1 könnten bei den GEP-NENs auch als Proliferationsmarker fungieren und künftig den Weg in die Routine-Diagnostik finden. Vorausgegangene Arbeiten und auch die klinische Erfahrung verdeutlicht, dass die klassische WHO-Einteilung alleinig basierend auf Ki-67 die Krankheitsverläufe bei den GEP-NENs in ihrer Heterogenität nicht erfassen kann. Anhand dieser Ergebnisse postulierten wir ergänzend zum Proliferationsindex Ki-67, zusätzlich die Differenzierung der heterogenen NET-Tumore in Subgruppen durch die immunhistochemische Bestimmung des „Marker-Sets“ bestehend aus Aurora Kinase B, Survivin und FOXM1. G3-Tumore sollten in NEN und NEC unterteilt werden. IGF-1R sollte in dessen Rolle als Progressionsmarker für Metastasierungsverhalten beim GEP-NEN weiter untersucht werden.

Basierend auf die immunhistochemischen Ergebnisse aus dieser Arbeit könnte die Etablierung folgender Marker Proteine als "Set" in der histopathologischen Routinediagnostik zur Charakterisierung der GEP-NEN - wie in Tabelle 18 vorgeschlagen - in Erwägung gezogen werden.

	G1 NET	G2 NEN	G3 NET	G3 NEC
Ki-67	<2%	3%-20%	30%-55%	>55%
Aurora B Zytosol	X	/	/	/
Aurora B Kern	/	/	X	X
Survivin Kern	/	X	X	X
FOXM1	/	/	/	X

Tabelle: 18: Vorschlag zur histopathologischen Untersuchungen in der Routineuntersuchung zur Charakterisierung der GEP-NEN: X= Relevanz, /= keine Relevanz

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig das Expressionsverhalten von AURORA B und deren Co-Regulatoren untersucht. Das hierfür erstelltes Patientenkollektiv umfasst eine große Fallzahl in Anbetracht der niedrigen Inzidenz der GEP-NEN. Diese Arbeit zeigt erstmalig auch das Expressionsmuster einer Reihe vor- und nebengeschalteten Co-Regulatoren um Aurora B und untersucht deren Status mit klinisch-pathologischen Parametern bei GEP-NENs.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die nukleäre Expression von Aurora B bei gastroenteropankreatischen Neoplasien prognostisch relevant ist.

Die immunohistochemische Untersuchung von Aurora B zeigte eine Assoziation mit Survivin-Expression im Kern. Zudem wurde eine hohe FOXM1-Co-Expression nachgewiesen. Die Marker zeigen eine signifikante Korrelation zueinander und sind mit einer schlechten Prognose verbunden. Zytoplasmatische Aurora B-Expression wurde ausschließlich in G1/G2-Tumoren nachgewiesen, nukleäre dagegen in G3-Tumoren. Der alleinige Ki-67-Nachweis ist zur prognostischen Einschätzung nicht ausreichend. Aurora B ist direkt mit dem Differenzierungsgrad, Tumorprogression und Aggressivität einer GEP-NEN-Erkrankung assoziiert. Der routinemäßige Nachweis dieser Parameter erscheint biologisch relevanter als Ki-67 allein und kann die Individualisierung der Therapiestrategien bei GEP-NENs möglicherweise erleichtern. Eine bessere Beschreibung der heterogenen G3-Tumore als G3-NET und G3-NEC können so in Subgruppen besser definiert werden. Die Nachweismethode ist in jedem pathologischen Institut verfügbar und in der Durchführung einfach. Die immunhistochemische Untersuchung des Expressionsverhaltens sollte in der künftigen Routinediagnostik Eingang finden, um die Ansprechbarkeit von Sensitivität und Resistenz auf eine individualisierte Target-Therapie zu identifizieren. Aurora B selbst als Angriffspunkt oder deren übergeordnete Transkriptionsfaktor FOXM1 erscheint auch therapeutisch vielversprechend. Des Weiteren bilden die Ergebnisse aus dieser retrospektiven Arbeit eine gute Grundlage für künftige prospektive Studien.

Anlehnend an die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten bereits zusätzlich neue Erkenntnisse hinsichtlich eines Protein-Netzwerks erarbeitet werden. Dabei liefert die vorliegende Arbeit nicht nur erstmalig Erkenntnisse über das Expressionsverhalten der Markerproteine des CPC und dessen übergeordneter Mediatoren, sondern dient auch als Grundlage für Arbeiten diverser Parallelprojekten (Briest et al. 2015; Fraedrich et al. 2014) und stellt ebenso eine Erweiterung bereits abgeschlossener Arbeit dar

(Grabowski et al. 2005). Es konnte eine Korrelation der nukleären Expression von Aurora B, Survivin und FOXM1 mit dem Überleben identifiziert werden. Die Schlussfolgerungen aus dieser Arbeit erlauben außerdem die Charakterisierung der einzelnen Tumorsubgruppen hinsichtlich deren klinisch-prognostischer Relevanz und liefern in diesem Zusammenhang den Vorschlag Markerproteine zu etablieren. Die vorliegende Arbeit bildet den Ausgangspunkt laufender Untersuchungen innerhalb unserer Arbeitsgruppe und leistet somit einen Beitrag zur künftigen molekularen Identifikation potenzieller Zielstrukturen für Diagnostik und Therapie der GEP-NENs.

Literaturverzeichnis

- 1 M. T. Adil, R. Nagaraja, V. Varma, Mehta N, Kumaran V, **Nundy S**. A Single Centre Analysis of Clinical Characteristics and Treatment of Endocrine Pancreatic Tumours. *Int J Surg Oncol*. 2015;2015:538948.
- 2 Aleskandarany, MA, Agarwal D, Negm OH, Ball G, Elmouna A, Ashankyty I, Nuglozeh E, Fazaludeen MF, Diez-Rodriguez M, Nolan CC, Tighe PJ, Green AR, Ellis IO, Rakha EA. The prognostic significance of STAT3 in invasive breast cancer: analysis of protein and mRNA expressions in large cohorts. *Breast Cancer Res. Treat* 2016;156(1):9-20.
- 3 Alexandraki KI, Karapanagioti A, Karoumpalis I, Boutzios G, Kaltsas GA. Advances and Current Concepts in the Medical Management of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9856140.
- 4 Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med*. 1997;3(8):917-21.
- 5 Anlauf M, Gerlach P, Schott M, Raffel A, Krausch M, Knoefel WT, Pavel M, Klöppel G. Pathology of neuroendocrine neoplasms. *Chirurg* 2011;82(7):567-73.
- 6 Bellelli R, Castellone MD, Garcia-Rostan G, Ugolini C, Nucera C, Sadow PM, Nappi TC, Salerno P, Cantisani MC, Basolo F, Gago TA, Salvatore G, Santoro M. FOXM1 is a molecular determinant of the mitogenic and invasive phenotype of anaplastic thyroid carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2012;21;19(5):695-710.
- 7 Benten D, Keller G, Quaas A, Schrader J, Gontarewicz A, Balabanov S, Braig M, Wege H, Moll J, Lohse AW, Brummendorf TH. Aurora kinase inhibitor PHA-739358 suppresses growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in a xenograft mouse model. *Neoplasia*. 2009;11(9):934-44.
- 8 Benten D, Behrang Y, Unrau L, Weissmann V, Wolters-Eisfeld G, Burdak-Rothkamm S, Stahl FR, Anlauf M, Grabowski P, Möbs M, Dieckhoff J, Sipos B, Fahl M, Eggers C, Perez D, Bockhorn M, Izbicki JR, Lohse AW, Schrader J. Establishment of the First Well-differentiated Human Pancreatic Neuroendocrine Tumor Model. *Mol Cancer Res*. 2018;16(3):496-507.

- 9 Bolton MA, Lan W, Powers SE, McClelland ML, Kuang J, Stukenberg PT. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 2002;13(9):3064-77.
- 10 Briest F, Grabowski P. PI3K-AKT-mTOR-Signaling and beyond: the Complex Network in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Theranostics*. 2014;4(4):336–365.
- 11 Briest F, Berg E, Grass I, Freitag H, Kaemmerer D, Lewens F, Christen F, Arsenic R, Altendorf-Hofmann A, Kunze A, Sanger J, Knosel T, Siegmund B, Hummel M, Grabowski P. FOXM1: A novel drug target in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Oncotarget* 2015;6(10):8185-99.
- 12 Caplin ME, Pavel M, Cwikla JB, Phan AT, Raderer M, Sedlackova E, Cadiot G, Wolin EM, Capdevila J, Wall L, Rindi G, Langley A, Martinez S, Blumberg J, Ruzsniewski P. Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2014;371(3):224-33.
- 13 Carmena M, Earnshaw WC. The cellular geography of aurora kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003;4(11):842-54.
- 14 Chan DW, Yu SY, Chiu PM, Yao KM, Liu VW, Cheung AN, Ngan HY. Over-expression of FOXM1 transcription factor is associated with cervical cancer progression and pathogenesis. *J Pathol.* 2008;215(3):245-52.
- 15 Chen J, Jin S, Tahir SK, Zhang H, Liu X, Sarthy AV, McGonigal TP, Liu Z, Rosenberg SH, Ng SC. Survivin enhances Aurora-B kinase activity and localizes Aurora-B in human cells. *J Biol Chem.* 2003;278.1:486-90.
- 16 Chieffi P, Cozzolino L, Kisslinger A, Libertini S, Staibano S, Mansueto G, De Rosa G, Villacci A, Vitale M, Linardopoulos S, Portella G, Tramontano D. Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation. *Prostate* 2006;66(3):326-33.
- 17 Dar AA, Goff LW, Majid S, Berlin J, El-Rifai W. Aurora kinase inhibitors- rising stars in cancer therapeutics? *Mol Cancer Ther.* 2010;9(2):268-78.
- 18 Dizdar L, Oesterwind KA, Riemer JC, Werner TA, Mersch S, Mohlendick B, Schutte SC, Verde PE, Raba K, Topp SA, Stoecklein NH, Esposito I, Knoefel WT, Krieg A. Preclinical assesement of survivin and XIAP as

prognostic biomarkers and therapeutic targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasia.

Oncotarget. 2017;31;8(5):8369-8382.

- 19 Dohi, T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* 2004;114(8):1117-27.
- 20 Ellis L, Shale MJ, Colemann MP. Corcinoid tumors of the gastrointestinal tract: trends in incidence in England since 1971. *Am J Gastroenterol* 2010;105(12):2563-2569.
- 21 Fraedrich K, Schrader J, Ittrich H, Keller G, Gontarewicz A, Matzat V, Kromminga A, Pace A, Moll J, Bläker M, Lohse AW, Hörsch D, Brümmendorf TH, Benten D. Targeting aurora kinases with danusertib (PHA-739358) inhibits growth of liver metastases from gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in an orthotopic xenograft model. *Clin Cancer Res.* 2012;18(17):4621-32.
- 22 Furtek SL, Backos DS, Matheson CJ, Reigan P. Strategies and Approaches of Targeting STAT3 for Cancer Treatment. *ACS Chem.Biol.* 2016;11(2):308-18.
- 23 Georgieva I, Koychev D, Wang Y, Holstein J, Hopfenmüller W, Zeitz M, Grabowski P. ZM447439, a novel promising aurora kinase inhibitor, provokes antiproliferative and proapoptotic effects alone and in combination with bio- and chemotherapeutic agents in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor cell lines. *Neuroendocrinology.* 2010;91(2):121-30.
- 24 Gerdes J, Becker MH, Key G, Cattoretti G. Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues. *J Pathol.* 1992;168(1):85-86.
- 25 Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984;133(4):1710-15.
- 26 Gloesenkamp C, Nitzsche B, Lim AR, Normant E, Vosburgh E, Schrader M, Ocker M, Scherübl H, Höpfner M. Heat shock protein 90 is a promising target for effective growth inhibition of gastrointestinal neuroendocrine tumors. *Int J Oncol.* 2012 May;40(5):1659-67.

- 27 Glover DM, Leibowitz MH, McLean DA, Parry H. Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*. 1995;81(1):95-105.
- 28 Gong AH, Wei P, Zhang SC, Yao J, Yuan Y, Zhou AD, Lang FF, Heimberger AB, Rao G, Huang S. FoxM1 Drives a Feed-Forward STAT3-Activation Signaling Loop That Promotes the Self-Renewal and Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Research*. 2015;75(11):2337-2348.
- 29 Grabowski P, Griss S, Arnold CN, Hörsch D, Göke R, Arnold R, Heine B, Stein H, Zeitz M, Scherübl H. Nuclear survivin is a powerful novel prognostic marker in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease. *Neuroendocrinology* 2005;81(1):1-9.
- 30 Grabowski P, Kühnel T, Mühr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Höpfner M, Germer CT, Scherübl H. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2003;13;88(1):115-9.
- 31 Gryko M, Kiśluk J, Cepowicz D, Zińczuk J, Kamocki Z, Guzińska-Ustymowicz K, Pryczynicz A, Czyżewska J, Kemon A, Kędra B. Expression of insulin-like growth factor receptor type 1 correlate with lymphatic metastases in human gastric cancer. *Pol J Pathol*. 2014;65(2):135-40.
- 32 Ha SY, Lee CH, Chang HK, Chang S, Kwon KY, Lee EH, Roh MS, Seo B. Differential expression of forkhead box M1 and its downstream cyclin-dependent kinase inhibitors p27(kip1) and p21(waf1/cip1) in the diagnosis of pulmonary neuroendocrine tumours. *Histopathology* 2012;60(5):731-9.
- 33 Hakam, A, Yeatman TJ, Lu L, Mora L, Marcet G, Nicosia SV, Karl RC, Coppola D. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in human colorectal cancer. *Hum Pathol*. 1999;30(10):1128-33.
- 34 Han KH, Kim MA, Park NH. Expression of aurora kinases: Predictor of tumor dissemination in uterine carcinosarcoma. *Histol Histopathol*. 2017;32(7):717-724.
- 35 Heetfeld M, Chougnet CN, Olsen IH, Rinke A, Borbath I, Crespo G, Barriuso J, Pavel M, O'Toole D, Walter T. Characteristics and treatment of patients with G3 gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. 2015;22(4):657-64.

- 36 Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005;352(10):997-1003.
- 37 Heskamp S, Boerman OC, Molkenboer-Kuennen JD, Wauters CA, Strobbe LJ, Mandigers CM, Bult P, Oyen WJ, van der Graaf WT, van Laarhoven HW. Upregulation of IGF-1R Expression during Neoadjuvant Therapy Predicts Poor Outcome in Breast Cancer Patients. *PLoS One.* 2015;10(2):e0117745.
- 38 Höpfner M, Baradari V, Huether A, Schöfl C, Scherübl H. The insulin-like growth factor receptor 1 is a promising target for novel treatment approaches in neuroendocrine gastrointestinal tumours. *Endocr.Relat Cancer* 2006;13(1)135-49.
- 39 Hristova M, Rocha-Ferreira E, Fontana X, Thei L, Buckle R, Christou M, Hompoonsup S, Gostelow N, Raivich G, Peebles D. Inhibition of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) reduces neonatal hypoxic-ischaemic brain damage. *J Neurochem.* 2016;136(5):981–994.
- 40 Huang, P. Y., Li Y, Luo DH, Hou X, Zeng TT, Li MQ, Mai HQ, Zhang L. Expression of Aurora-B and FOXM1 predict poor survival in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Strahlenther. Onkol.* 2015;191(8):649-55.
- 41 Hui MK, Chan KW, Luk JM, Lee NP, Chung Y, Cheung LC, Srivastava G, Tsao SW, Tang JC, Law S. Cytoplasmic Forkhead box M1 (FoxM1) in esophageal squamous cell carcinoma significantly correlates with pathological disease stage. *World J Surg.* 2012;36(1):90-7.
- 42 Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, Schulick RD, Tang LH, Wolf-gang CL, Choti MA, Velculescu VE, Diaz LA Jr, Vogelstein B, Kinzler KW, Hruban RH, Pa-padopoulos N. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science.* 2011;331(6021):1199–1203.
- 43 Kalinichenko VV, Major ML, Wang X, Petrovic V, Kuechle J, Yoder HM, Dennewitz MB, Shin B, Datta A, Raychaudhuri P, Costa RH. Foxm1b transcription factor is essential for development of hepatocellular

- carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. *Genes Dev.* 2004;18(7):830-50.
- 44 Katayama H, Sen S. Aurora kinase inhibitors as anticancer molecules. *Biochim. Biophys Acta* 2010;1799(10-12):829-39.
- 45 Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58(22):5071-74.
- 46 Kim IM, Ackerson T, Ramakrishna S, Tretiakova M, Wang IC, Kalin TV, Major ML, Gusarova GA, Yoder HM, Costa RH, Kalinichenko VV. The Forkhead Box m1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer. *Cancer Res.* 2006;66(4):2153-61.
- 47 Kim KW, Mutter RW, Willey CD, Subhawong TK, Shinohara ET, Albert JM, Ling G, Cao C, Gi YJ, Lu B. Inhibition of survivin and aurora B kinase sensitizes mesothelioma cells by enhancing mitotic arrests. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007;67(5):1519-25.
- 48 Klöppel G. Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. *Pathologie* 2003;24(4):287-96.
- 49 Kloppel G, Couvelard A, Perren A, Komminoth P, McNicol AM, Nilsson O, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B, Papotti M, Rindi G, Plöckinger U. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: towards a standardized approach to the diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and their prognostic stratification. *Neuroendocrinology* 2009;90(2):162-66
- 50 Klöppel G, Klimsta D, Hruban R, Adsay V, Capella C, Couvelard A, Komminoth P, La Rosa S, Ohike N, Osamura RY, Perren A, Scoazec JY, Rindi G. Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Update on the New world Health Organization Classification. *AJSP: Reviews & Reports* 2017;22(5): 233-239.
- 51 Lee EC, Frolov A, Li R, Ayala G, Greenberg NM. Targeting Aurora kinases for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res* 2006;66(10):4996-5002.
- 52 Lee Y, Kim KH, Kim DG, Cho HJ, Kim Y, Rheey J, Shin K, Seo YJ, Choi YS, Lee JI, Lee J, Joo KM, Nam DH. FoxM1 Promotes Stemness and

- Radio-Resistance of Glioblastoma by Regulating the Master Stem Cell Regulator Sox2. *PLoS One*. 2015;10(10):e0137703.
- 53 Libutti SK. Therapy: Blockade of IGF-1R - not effective in neuroendocrine tumours. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(7):389-390.
- 54 Lindholm EB, Lyons J 3rd, Anthony CT, Boudreaux JP, Wang YZ, Woltering EA. Do primary neuroendocrine tumors and metastasis have the same characteristics? *J Surg Res*. 2012;174.(2):200-06.
- 55 Lloret M, Lara PC, Bordón E, Pinar B, Rey A, Falcón O, Molano F, Hernández MA. IGF-1R expression in localized cervical carcinoma patients treated by radiochemotherapy. *Gynecol Oncol*. 2007;106(1):8-11.
- 56 Mehra R, Serebriiskii IG, Burtness B, Astsaturov I, Golemis EA. Aurora kinases in head and neck cancer. *Lancet Oncol*. 2013;14(10):e425-35.
- 57 Mencalha AL, Binato R, Ferreira GM, Du Rocher B, Abdelhay E. Forkhead box M1 (FoxM1) gene is a new STAT3 transcriptional factor target and is essential for proliferation, survival and DNA repair of K562 cell line. *PLoS One*. 2012;7(10):e48160.
- 58 Miederer M, Seidl S, Buck A, Scheidhauer K, Wester HJ, Schwaiger M, Perren A. Correlation of immunohistopathological expression of somatostatin receptor 2 with standardised uptake values in 68Ga-DOTATOC PET/CT. *Eur J Nucl Med. Mol Imaging* 2009;36(1):48-52.
- 59 Modlin IM, Lye KD, Kidd M. Carcinoid tumors of the stomach. *Surg Oncol*. 2003;12.(2):153-72.
- 60 Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, Caplin M, Delle Fave G, Kaltsas GA, Krenning EP, Moss SF, Nilsson O, Rindi G, Salazar R, Ruszniewski P, Sundin A. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol*. 2008;9(1):61-72.
- 61 Modlin IM, Kidd M, Bodei L, Drozdov I, Aslanian H. The clinical utility of a novel blood-based multi-transcriptome assay of neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(8):1223-1233.
- 62 Moore AS, Blagg J, Linardopoulos S, Pearson AD. Aurora kinase inhibitors: novel small molecules with promising activity in acute myeloid and Philadelphia-positive leukemias. *Leukemia*. 2010;24:671-8.

- 63 Münzberg C1, Höhn K, Krndija D, Maaß U, Bartsch DK, Slater EP, Oswald F, Walther P, Seufferlein T, von Wichert G. IGF-1 drives chromogranin A secretion via activation of Arf1 in human neuroendocrine tumour cells. *J Cell Mol Med.* 2015;19(5):948-59.
- 64 Nestal de Moraes G, Delbue D, Silva KL, Robaina MC, Khongkow P, Gomes AR, Zona S, Crocamo S, Mencialha AL, Magalhães LM, Lam EW, Maia RC. FOXM1 targets XIAP and Survivin to modulate breast cancer survival and chemoresistance. *Cell Signal.* 2015;27(12):2496-505.
- 65 Oberg K. Somatostatin-receptor mediated diagnosis and treatment in gastrointestinal neuroendocrine tumours (GEP-NET's). *Rocz Akad Med Bialymst* 2005;50:62-68.
- 66 Ouban A, Muraca P, Yeatman T, Coppola D. Expression and distribution of insulin-like growth factor-1 receptor in human carcinomas. *Hum Pathol.* 2003;34(8):803-08.
- 67 Pannone G, Hindi SA, Santoro A, Sanguedolce F, Rubini C, Cincione RI, De Maria S, Tortorella S, Rocchetti R, Cagiano S, Pedicillo C, Serpico R, Lo Muzio L, Bufo P. Aurora B expression as a prognostic indicator and possible therapeutic target in oral squamous cell carcinoma. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2011;24(1):79-88.
- 68 Pape UF, Berndt U, Müller-Nordhorn J, Böhmig M, Roll S, Koch M, Willich SN, Wiedenmann B. Prognostic factors of long-term outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr.Relat Cancer* 2008;15(4):1083-97.
- 69 Pavel M, O' Toole D, Costa F, Capdevila J, Gross D, Kianmanesh R, Krenning E, Knigge U, Salazar R, Pape UF, Öberg K; Vienna Consensus Conference participants. ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Distant Metastatic Disease of Intestinal, Pancreatic, Bronchial Neuroendocrine Neoplasms (NEN) and NEN of Unknown Primary Site. Vienna Consensus Conference participants. *Neuroendocrinology* 2016;103(2):172-85.
- 70 Pennati M, Folini M, Zaffaroni N. Targeting survivin in cancer therapy: fulfilled promises and open questions. *Carcinogenesis* 2007;28(6):1133-39.

- 71 Peters G, Gongoll S, Langner C, Mengel M, Piso P, Klempnauer J, Rüschoff J, Kreipe H, von Wasielewski R. IGF-1R, IGF-1 and IGF-2 expression as potential prognostic and predictive markers in colorectal-cancer. *Virchows Arch.* 2003;443(2):139-45.
- 72 Qi G, Ogawa I, Kudo Y, Miyauchi M, Siriwardena BS, Shimamoto F, Tatsuka M, Takata T. Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer. *Virchows Arch* 2007; 450(3):297-302.
- 73 Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe.* 1987;8(3):138-40.
- 74 Rindi G. The ENETS guidelines: the new TNM classification system. *Tumori* 2010;96(5):806-09.
- 75 Rindi G, Falconi M, Klersy C, Albarello L, Boninsegna L, Buchler MW, Capella C, Caplin M, Couvelard A, Doglioni C, Delle Fave G, Fischer L, Fusai G, de Herder WW, Jann H, Komminoth P, de Krijger RR, La Rosa S, Luong TV, Pape U, Perren A, Ruzsniwski P, Scarpa A, Schmitt A, Solcia E, Wiedenmann B. TNM staging of neoplasms of the endocrine pancreas: results from a large international cohort study. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(10):764-77.
- 76 Rinke A, Gress TM. Neuroendocrine Cancer, Therapeutic Strategies in G3 Cancers. *Digestion.* 2017;95(2):109-114.
- 77 Rinke A, Müller HH, Schade-Brittinger C, Klose KJ, Barth P, Wied M, Mayer C, Aminossadati B, Pape UF, Bläker M, Harder J, Arnold C, Gress T, Arnold R; PROMID Study Group. 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. *J Clin Oncol.* 2009;27(28):4656-63.
- 78 Rodriguez JA, Lens SM, Span SW, Vader G, Medema RH, Kruyt FA, Giaccone G. Subcellular localization and nucleocytoplasmic transport of the chromosomal passenger proteins before nuclear envelope breakdown. *Oncogene.* 2006;25(35):4867-79.

- 79 Safatle-Ribeiro AV, Ribeiro U Jr, Corbett CE, Iriya K, Kobata CH, Sakai P, Yagi OK, Pinto PE Jr, Zilberstein B, Gama-Rodrigues J. Prognostic value of immunohistochemistry in gastric neuroendocrine (carcinoid) tumors. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2007;19(1):21-28.
- 80 Scherübl H, Streller B, Stabenow R, Herbst H, Höpfner M, Schwertner C, Steinberg J, Eick J, Ring W, Tiwari K, Zappe SM. Clinically detected gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors are on the rise: Epidemiological changes in Germany. *World Journal of Gastroenterology.* 2013;19(47):9012-9019.
- 81 Schott, M, Oberg K. Neuroendocrine neoplasms. *Horm Metab Res* 2011;43(12): 823-24.
- 82 Sherif SF. The Potential Role of Aurora Kinase Inhibitors in Haematological Malignancies. *Br J Haematol.* 2011; 155(5):561–579.
- 83 Shi J, Tan SY, Lee AZE, Zhang S, Sasidharan SL, Wong B, Tan MH, Lim CM. Restoring apoptosis dysregulation using survivin inhibitor in nasopharyngeal cancer. *Head Neck.* 2020;42(5):913-923.
- 84 Shimizu C, Hasegawa T, Tani Y, Takahashi F, Takeuchi M, Watanabe T, Ando M, Katsumata N, Fujiwara Y. Expression of insulin-like growth factor 1 receptor in primary breast cancer: immunohistochemical analysis. *Hum.Pathol.* 2004;35(12):1537-42.
- 85 Shin DH, Lee HJ, Min HY, Choi SP, Lee MS, Lee JW, Johnson FM, Mehta K, Lippman SM, Glisson BS, Lee HY. Combating resistance to anti-IGFR antibody by targeting the integrin beta3-Src pathway. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(20):1558-70.
- 86 Sorbye H, Welin S, Langer SW, Vestermark LW, Holt N, Osterlund P, Dueland S, Hofslø E, Guren MG, Ohrling K, Birkemeyer E, Thiis-Evensen E, Biagini M, Gronbaek H, Soveri LM, Olsen IH, Federspiel B, Assmus J, Janson ET, Knigge U. Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. *Ann Oncol.* 2013;24(1):152-60.
- 87 Sternberger LA, Petrali JP. The unlabeled antibody enzyme method. Attempted use of peroxidase-conjugated antigen as the third layer in the technique. *J Histochem Cytochem.* 1977;25(9):1036-42.

- 88 Strosberg JR, Chan JA, Ryan DP, Meyerhardt JA, Fuchs CS, Abrams T, Regan E, Brady R, Weber J, Campos T, Kvols LK, Kulke MH. A multi-institutional, phase II open-label study of ganitumab (AMG 479) in advanced carcinoid and pancreatic neuroendocrine tumors. *J Gastrointest Oncol.* 2011;8(1):139–147.
- 89 Tuncel H, Shimamoto F, Kaneko Guangying Qi H, Aoki E, Jikihara H, Nakai S, Takata T, Tatsuka M. Nuclear Aurora B and cytoplasmic Survivin expression is involved in lymph node metastasis of colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2012;3(5):1109-1114.
- 90 Uppin MS1, Uppin SG1, Sunil CS1, Hui M, Paul TR, Bheerappa N. Clinicopathologic study of neuroendocrine tumors of gastroenteropancreatic tract: a single institutional experience. *J Gastrointest Oncol.* 2017;8(1):139-147.
- 91 Vaira V, Lee CW, Goel HL, Bosari S, Languino LR, Altieri DC. Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling. *Oncogene* 2007;26(19):2678-84.
- 92 Vandamme T, Peeters M, Dogan F, Pauwels P, Van Assche E, Beyens M, Mortier G, Vandeweyer G, de Herder W, Van Camp G, Hofland LJ, Op de Beeck K. Whole-exome characterization of pancreatic neuroendocrine tumor cell lines BON-1 and QGP-1. *J Mol Endocrinol.* 2015;54(2):137-47.
- 93 Vischioni B, Oudejans JJ, Vos W, Rodriguez JA, Giaccone G. Frequent overexpression of aurora B kinase, a novel drug target, in non-small cell lung carcinoma patients. *Mol.Cancer Ther.* 2006;5(11):2905-13.
- 94 von Wichert G, et al. Jehle PM, Hoeflich A, Koschnick S, Dralle H, Wolf E, Wiedenmann B, Boehm BO, Adler G, Seufferlein T. Insulin-like growth factor-I is an autocrine regulator of chromogranin A secretion and growth in human neuroendocrine tumor cells. *Cancer Res.* 2000;60(16):4573-81.
- 95 Wang IC, Chen YJ, Hughes D, Petrovic V, Major ML, Park HJ, Tan Y, Ackerson T, Costa RH. Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol.* 2005;25(24):10875-94.
- 96 Wang L, Zhang GM, Feng ZH. Down-regulation of survivin expression reversed multidrug resistance in adriamycin-resistant HL-60/ADR cell line. *Acta Pharmacol Sin.* 2003;24(12):1235-40.

- 97 Wang Y, Hammersen S, Stiehr V, Moskopp D. Colonoscopic findings in patients with acromegaly. *J. Gastroenterologische und Hepatologische Erkrankung* 2017;15(4):80-88.
- 98 Wierstra I, Alves J. FOXM1, a typical proliferation-associated transcription factor. *Biol Chem.* 2007;388(12):1257-74.
- 99 Wiedemuth R. Untersuchungen zur Funktion des Inhibitor der Apoptose Proteins Survivin in der Einfluss posttranslationaler Modifikationen chromosomalen Stabilität und „DNA Damage Response“ von Tumorzellen Hüllproteins. Technische Universität Dresden, Dissertation, 2012, Seite 30.
- 100 Wu Y, Yakar S, Zhao L, Hennighausen L, LeRoith D. Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res.* 2002;62(4):1030-35.
- 101 Xu N, Zhang X, Wang X, Ge HY, Wang XY, Garfield D, Yang P, Song YL, Bai CX. FoxM1 mediated resistance to gefitinib in non-small-cell lung cancer cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2012;33(5):675-81.
- 102 Xu YH, Lu S. A meta-analysis of STAT3 and phospho-STAT3 expression and Survival of patients with non-small-cell lung cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2014;40(3):311-7.
- 103 Yamamoto M, Fukuoka H, Iguchi G, Matsumoto R, Takahashi M, Nishizawa H, Suda K, Bando H, Takahashi Y. The prevalence and associated factors of colorectal neoplasms in acromegaly: a single center based study. *Pituitary* 2015;18(3):343-51.
- 104 Yan Y, Hu F, Wu W, Ma R, Huang H. Expression characteristics of proteins of IGF-1R, p-Akt, and survivin in papillary thyroid carcinoma patients with type 2 diabetes mellitus *Medicine (Baltimore).* 2017; 96(12):e6393.
- 105 Yin M, Guan X, Liao Z, Wei Q. Insulin-like growth factor-1 receptor-targeted therapy for non-small cell lung cancer: a mini review. *Am J Transl Res.* 2009;1(2):101–114.
- 106 Youness RA, El-Tayebi HM, Assal RA, Hosny K, Esmat G, Abdelaziz AI. MicroRNA-486-5p enhances hepatocellular carcinoma tumor suppression

through repression of IGF-1R and its downstream mTOR, STAT3 and c-Myc. *Oncol Lett.* 2016;12(4):2567-2573.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Yawen Wang, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Immunhistochemische Untersuchung zur Bedeutung Mitose- assoziierter Kinasen des Chromosomal Passenger Komplexes bei Gastroenteropankreatischen Neuroendokrinen Neoplasien: Potenzielles Target und innovative Ansätze in der Diagnostik“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die ich 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 an etwaige Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der unten stehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, 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.

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung

Die Promovendin hatte folgenden Anteil an folgende Publikationen:

Publikation 1:

Georgieva I, Koychev D, Wang Y, Holstein J, Hopfenmüller W, Zeitz M, Grabowski P.

ZM447439, a novel promising aurora kinase inhibitor, provokes antiproliferative and proapoptotic effects alone and in combination with bio- and chemotherapeutic agents in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor cell lines. *Neuroendocrinology*. 2010;91(2):121-30.

Beitrag im Einzelnen: Mitwirkung bei der Erhebung des Patientenkollektivs, Archiv-Arbeit und Beiwohnen der Tumorsprechstunde/ Follow-Up Sprechstunde, Anschreiben des Landeseinwohneramtes, selbstständige Erhebung von Fragebögen bei Hausärzten. Komplettierung der Follow-Up Daten im Kollektiv. Eigenständiges Herausarbeiten der Färbeprotokolle und selbstständige Durchführung der Immunhistochemie. Lichtmikroskopische Auswertung des immunhistochemisch behandelten FFPEs allein und gemeinsam mit Frau PD Dr. med. Patricia Grabowski.

Publikation 2:

Briest F, Wang Y, Arsenic R, Elezkurtaj S, Berg E, Greshake S, Lock AC, Hörsch D, Arnold CN, Hummel M, Siegmund B, Grabowski P.

Immunohistochemical Study of Mitosis-regulatory Proteins in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms. 2019. *Anticancer Research*.

Beitrag im Einzelnen: Eigenständiges Aufstellen und Erhebung des Patientenkollektiv und der Follow-up Daten, Archiv-Arbeit und Beiwohnen der Tumorsprechstunde/ Follow-Up Sprechstunde, Anschreiben des Landeseinwohneramtes, selbstständige Erhebung von Fragebögen bei Hausärzten. Komplettierung der Follow-Up Daten im Kollektiv. Eigenständiges Herausarbeiten der Färbeprotokolle und selbstständige

Durchführung der Immunhistochemie. Lichtmikroskopische Auswertung des immunhistochemisch behandelten FFPEs allein und gemeinsam mit Frau PD Dr. med. P. Grabowski, Secondlook mit Frau PD Dr. med. R. Arsenic. Statistische Auswertung zusammen mit Frau Dr. rer. nat F. Briest. FOXM1 wurde in einem anderen Projekt unserer Arbeitsgruppe mit einem anders definierten Patientenkollektiv gefärbt, wobei Überschneidungen mit dem hier dargestellten Kollektiv bestanden.

Berlin, _____

PD Dr. med. Patricia Grabowski
(Erstbetreuende Hochschullehrerin)

Yawen Wang
(Doktorandin)

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Titel und Autoren	Publikationsart Publikationsjahr	Vortragsort/ Journal/Verlag
<p>Clinical Insights to pituitary adenomas among fairytale characters by Brothers Grimm</p> <p>Wang Y, Moskopp D</p>	<p>Poster 2021</p>	<p>Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie</p>
<p>Carotid ultrasound assessment in patients with acromegaly</p> <p>Wang Y, Hammersen S, Moskopp D</p>	<p>Poster 2020</p>	<p>Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Endokrinologie</p>
<p>Clinical situation, therapy, and follow up of adult craniopharyngioma - report from the German craniopharyngioma registry</p> <p>Mende KC, Kellner T, Petersenn S, Honegger J, Evangelista-Zamora R, Droste M, Stalla G, Deutschbein T, Wang Y, Moskopp D, Knappe U, Schilbach K, Flitsch J</p>	<p>Originalarbeit 2020</p>	<p>The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism</p>
<p>Xanthogranulomas, Rathke's cleft cysts and colloid cysts - epithelial lesions of the sellar region: Clinical and endocrinological features after surgery in a single center cohort</p> <p>Wang Y, Hammersen S, Moskopp D</p>	<p>Poster 2019</p>	<p>Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie</p>
<p>Immunohistochemical Study of Mitosis-Regulatory Proteins in</p>	<p>Originalarbeit 2019</p>	<p>Anticancer Research</p>

Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms Briest F, Wang Y , Arsenic R, Elezkurtaj S, Berg E, Greshake S, Lock AC, Hörsch D, Arnold CN, Hummel M, Siegmund B, Grabowski P		
Colonoscopic findings in patients with acromegaly Wang Y , Hammersen S, Stiehr V, Moskopp D	Originalarbeit 2017	Journal für Gastroenterologische und Hepatische Erkrankungen Springer Vienna
The transsphenoidal approach as a suitable tool for the treatment of chordomas and other skull base pathologies Wang Y , Moskopp D	Vortrag 2017	Tagung der Gesellschaft für Schädelbasischirurgie
Surgical outcome of the transsphenoidal approach in patients ≥ 70 years with sella pathologies Wang Y , Hammersen S, Moskopp D	Vortrag 2017	Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Neurochirurgie
How likely am I to clip an aneurysm? Question from a resident's point of view Wang Y , Hammersen S, Moskopp D	Vortrag 2017	Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie
Impact of anticoagulants in elderly patients with sella pathologies Wang Y , Hammersen S, Moskopp D	Poster 2017	Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie
Acromegaly: Is there a need for colorectal cancer screening?	Poster 2016	Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für

Wang Y, Hammersen S, Moskopp D		Endokrinologie
Immunohistochemical study of Aurora B proves association with differentiation and expression of crucial progression markers in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms Wang Y, Briest F, Greshake S, Lock A, Hörsch D, Arnold C, Berg E, Hummel M, Siegmund B, Grabowski P	Poster 2016	Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Endokrinologie
Acromegaly: Repeat transsphenoidal surgery versus medical and radiation treatment in patients not achieving initial surgical remission. A study supporting early reoperation? Wang Y, Hammersen S, Moskopp D	Vortrag 2016	Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie
Can oral glucose tolerance test on the 1st postoperative day predict remission and optimize the outcome after transsphenoidal surgery in patients with acromegaly? Wang Y, Hammersen S, Moskopp D	Vortrag 2015	Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie
Analysis of the value of bilateral inferior petrosal sinus sampling (BIPSS) in Cushing's Syndrome. Can BIPSS be employed to guide surgical resection? Wang Y, Hammersen S, Moskopp D	Joint meeting Vortrag 2014	Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie
Traumatische Läsionen des kraniozervikalen Übergangs Moskopp D, Wang Y , Pöll W	Buchkapitel 2014	Handbuch für Neurochirurgie Schattauer Verlag
Which hormone receptors are expressed in hormone secreting pituitary adenomas?	Vortrag 2013	Jahrestagung der Deutschen

<p>Immunohistochemical evaluation of 36 patients from a 4- years period</p> <p>Wang Y, Hammersen S, Koch A, Moskopp D</p>		<p>Gesellschaft für Neurochirurgie</p>
<p>Combined atlanto-dental fractures: A report of five patients</p> <p>Wang Y, Zielke AM, Moskopp</p>	<p>Vortrag 2013</p>	<p>Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie</p>
<p>Maffucci Syndrome in disguise: A 26 year old man with suprasellar enchondroma simulating pituitary adenoma</p> <p>Wang Y, Hammersen S, Moskopp D</p>	<p>Poster 2013</p>	<p>Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie</p>
<p>Two seemingly similar pituitary lesions, but completely different treatment approaches: Comparison of two cases</p> <p>Wang Y, Hammersen S, Moskopp D</p>	<p>Poster 2013</p>	<p>Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie</p>
<p>Transsphenoidal surgery and endoscopic assistance as effective procedures to treat sella pathologies</p> <p>Wang Y, Hammersen S, Moskopp D</p>	<p>Poster 2013</p>	<p>Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie</p>
<p>ZM447439, a novel promising aurora kinase inhibitor, provokes antiproliferative and proapoptotic effects alone and in combination with bio- and chemotherapeutic agents in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor cell lines</p> <p>Georgieva I, Koychev D, Wang Y, Holstein J, Hopfenmüller W, Zeitz M, Grabowski P</p>	<p>Originalarbeit 2010</p>	<p>Neuroendocrinology</p>
<p>Immunohistochemical investigation of aurora kinase B – a novel promising target</p>	<p>Vortrag 2009</p>	<p>Jahrestagung European Student</p>

<p>in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease</p> <p>Wang Y, Grabowski P</p>		<p>Conference</p>
<p>Aurora kinases as novel drug targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease: ZM447439, a new specific inhibitor, exerts antiproliferative and pro-apoptotic effects alone and in combination with established bio- and chemotherapeutic agents in BON and QGP-1 cells</p> <p>Georgieva I, Wang Y, Koychev D, Griß S, Arnold C, Hörsch D, Stein H, Zeitz M, Grabowski P</p>	<p>Poster 2008</p> <p>Poster- auszeichnung</p>	<p>European Neuroendocrine Tumor Society</p>

Danksagung

Meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Patricia Grabowski danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und die wissenschaftliche Betreuung. Ich konnte von ihrer langjährigen Erfahrung auf dem Gebiet der Neuroendokrinen Tumore lernen und erhielt wertvolle Anregungen bei der Erstellung dieser Arbeit.

Allen Kolleginnen und Kollegen der AG Grabowski danke ich für die schöne gemeinsame Zeit im und außerhalb des Labors, insbesondere gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. Franziska K. Briest für ihre kompetente Hilfestellung bei der Statistik.

Herrn PD Dr. med. Bernhard Heine, ehemals Institut für Pathologie, Charité Campus Benjamin Franklin, danke ich für die freundliche Überlassung des Tumormaterials. Desweiteren bedanke ich mich bei Frau Constanze Cieluch und Frau Erika Berg, die mich mit der Arbeitsmethode der Immunhistochemie vertraut gemacht haben und Frau PD Dr. med. Ruza Arsenic für ihre unglaubliche Geduld und ihren "zweiten Blick" durch das Mikroskop.

Ich danke Frau Dr. med. Stefanie Hammersen, die mich bereits zu Beginn meines Studiums für das Fach Neurochirurgie begeistert hat und mich seitdem, nicht nur auf dem Weg zur Neurochirurgin, sondern auch in allen Lebensbereichen positiv stimmt und unterstützt.

Ein besonderer Dank gilt meinem Lehrer Prof. Dr. med. Dag Moskopp, Klinikdirektor der Neurochirurgie im Vivantes Klinikum im Friedrichshain, für die intensive Förderung und wertvolle Ausbildung, sowie den unermüdlichen Ansporn.

Meinen Eltern gilt mein herzlichster Dank für die immerwährende Unterstützung, Liebe, Fürsorge und Geduld während meines Studiums und in meinem Leben. Ihnen habe ich alles zu verdanken.