

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

DISSERTATION

Die prognostische Bedeutung von Survivin bei
gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sonja Greshake

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. P. Grabowski
2. Priv.-Doz. Dr. med. S. Faiss
3. Prof. Dr. med. A. Schmitt-Gräff

Datum der Promotion: 08.04.2011

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	6
Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	8
Einleitung	9
Das neuroendokrine Zellsystem.....	9
Neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems	9
Epidemiologie	9
Ätiopathogenese	9
Diagnostik	11
Der Nachweis der neuroendokrinen Differenzierung durch unspezifische Sekretionsprodukte	11
Der Nachweis der Funktionalität des Tumors durch eine vermehrte zellspezifische Hormonproduktion	12
Therapie.....	12
Therapiestrategien	12
Klassifikation und Prognose.....	16
Klassifikation	16
Prognose	19
Fragestellung	23
Material und Methoden	24
Patienten.....	24
Die Erstellung des Patientenkollektivs.....	24
Material	28
Tumorgewebe	28
Kontrollen	28
Reagenzien der Immunhistochemie.....	28
Antikörper	28
Chemikalien.....	29
Methoden	29
Der immunhistochemische Nachweis von Survivin	29
Der immunhistochemische Nachweis von Ki-67.....	31
Auswertung	32
Statistik.....	33

Ergebnisse	34
Die Expression und Lokalisation von Survivin in GEP-NET im gesamten Patientenkollektiv	34
Die Expression und Lokalisation von Survivin, von Ki-67 und Prognose bei den nach WHO klassifizierten Tumoren	36
Lokalisierte GEP-NET: WDET (WHO-Klasse I)	36
Metastasierte GEP-NET:WDEC (WHO-Klasse II)	36
Metastasierte GEP-NET: PDEC (WHO-Klasse III).....	38
Die prognostische Bedeutung der Expression von Survivin in Korrelation mit Ki-67..	39
Diskussion	44
Die prognostische Bedeutung von Survivin bei GEP-NET in der vorliegenden Untersuchung	44
Der Vergleich der Expression von Survivin bei Primärtumor und Metastase.....	44
Die prognostische Bedeutung von Survivin bei GEP-NET und anderen neuro- endokrinen Tumorentitäten in der Literatur.....	45
Die prognostische Bedeutung der subzellulären Verteilung von Survivin.....	45
Die Klassifikation des Patientenkollektivs nach den WHO-Kriterien und nach dem neuen TNM-System.....	48
Ki-67/MIB-1 als prognostischer Marker	49
Der Vergleich der Expression von Ki-67/MIB-1 und Survivin.....	50
Die Bedeutung des Nachweises von Survivin für die Therapie	51
Zusammenfassung.....	54
Literaturverzeichnis	55
Erklärung.....	67
Lebenslauf.....	68
Publikationsliste	69
Originalarbeiten	69
Kongressbeiträge, Abstracts, Poster	69
Danksagung.....	71

Abkürzungen

ABC	<i>Avidin-Biotin-Complex</i>
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische-Phosphatase
APUD	<i>amine precursor uptake and decarboxylation</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
CD 57	<i>cluster of differentiation</i>
CDK4	Cyclin-abhängige Kinase 4
CgA	Chromogranin A
CT	Computertomogramm
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DCC	<i>deleted in colorectal carcinoma</i>
DNES	Diffuses neuroendokrines System
Dox	Doxorubicin
DTPA	111-In-dietylenetriamine penta-acetic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
FAS	Kombinationschemotherapie bestehend aus 5-FU, Doxorubizin und Streptozocin
FDG-PET	Fluorodeoxiglukose-Positronen-Emissions-Tomographie
5-FU	5-Fluoruracil
G1 Phase	<i>gap 1 phase</i>
68 GA- DOTA-TOC	68 Gallium-1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10- tetraessigsäure-Tyrosin-Octreotid
GEP-NET	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumoren
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
HBXIP	<i>hepatitis B virus X interacting protein</i>
HER 2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HPF	<i>high power fields</i>
JÜR	Jahres-Überlebensrate
Ki-67	„ki“ steht für Kiel; vom Institut für Pathologie der Universität Kiel stammte der Antikörperklon gegen das Antigen Ki-67
Leu	Leucin
LITT	laserinduzierte Thermotherapie

LOH	<i>loss of heterocytosity</i>
MEN	multiple endokrine Neoplasie
MIB-1	Mikrobiologisches Institut Borstel, Ki-67-Marker 1
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NEC	<i>neuroendocrine carcinoma</i>
NSE	neuronenspezifische Enolase
p 53	Protein 53 (scheinbare Masse von 53 kDa)
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDEC	<i>poorly differentiated endocrine tumors</i>
PFA	Pfortaderembolisation
PPI	Protonenpumpeninhibitoren
PRRT	Peptidrezeptor-vermittelte Radionuklidtherapie
RFA	Radiofrequenzablation
RR	<i>response rate</i>
S	<i>survival</i>
SIRT	selektive interne Strahlentherapie
SPECT	Single-Photon-Emissionscomputertomographie
SSA	Somatostatinanaloga
SSRT	Somatostatinrezeptoren
STZ	Streptozotocin
TACE	transarterielle Chemoembolisation
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TNM	tumor, nodes, metastasis
Urin-5-HIAA	<i>Urin-5-Hydroxyindoleacetic acid</i>
VIPom	vasoaktiv intestinales Peptid produzierender Tumor
WDET	<i>well differentiated endocrine tumor</i>
WDEC	<i>well differentiated endocrine carcinoma</i>
WHO	World Health Organisation
XIAP	<i>X-linked mammalian inhibitor of apoptosis protein</i>
ZES	Zollinger-Ellison-Syndrom

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tab. 1	Therapierichtlinien für GEP-NET gemäß ENETS	14-15
Tab. 2	Risikostratifizierung der GEP-NET, WHO 2000	17
Tab. 3	WHO-Klassifikation der neuroendokrinen Pankreastumoren	17
Tab. 4	TNM-Klassifikation der NET des Pankreas	18
Tab. 5	TNM-Klassifikation der NET von Jejunum und Duodenum	19
Tab. 6	Klinisch-pathologische Daten aller 89 Patienten und Tumoren	26
Tab. 7	Zusätzliche nicht-chirurgische Behandlung von 37 Patienten (WDEC)	27
Tab. 8	Verwendete Antikörper	28
Tab. 9	Verwendete Chemikalien	29
Tab. 10	Übersicht der Nachweise von zytoplasmatischem und nukleärem Survivin und Ki-67 bei den in die drei WHO-Klassen eingeteilten Tumoren	38
Abb. 1	Die subzelluläre Lokalisation von Survivin	35
Abb. 2	Expression von nukleärem Survivin und Ki-67-Antigen bei paarweisen Serienschnitten	37
Abb. 3	Kumulatives Überleben der in die drei WHO-Klassen eingeteilten GEP-NET	39
Abb. 4	Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patienten mit WDEC in Relation zur Expression von nukleärem Survivin	40
Abb. 5	Kaplan-Meier-Überlebenskurven der WDEC in Relation zur Expression von Ki-67	41
Abb. 6	Kaplan-Meier-Überlebenskurven der WDEC/Korrelation der Expression von nukleärem Survivin und Ki-67	42

Einleitung

Das neuroendokrine Zellsystem

Die Zellen des gastroenteropankreatischen Systems werden phänotypisch dem diffusen neuroendokrinen System zugeordnet, dem ca. 15 hochspezialisierte epitheliale Zelltypen von endodermalem Ursprung angehören (Rindi, Leiter et al. 2004). Diese exprimieren neben einer zellspezifischen endo- oder parakrinen Hormonproduktion bestimmte Markerproteine wie Synaptophysin, neuronenspezifische Enolase und Chromogranin. Neuroendokrine Zellen, oft einzeln oder als Zellcluster (z.B. Inselzellen des Pankreas) zwischen anderen Zellen angeordnet, sind in den meisten Oberflächenepithelien des Körpers vorhanden (Wilander and Grimelius 1993). Neuroendokrine Zellen weisen zwar viele morphologische, biochemische und funktionelle Gemeinsamkeiten auf (Wiedenmann, John et al. 1998), durch die große Heterogenität der enteroendokrinen Zellen entsteht jedoch die Komplexität der neuroendokrinen Tumoren (Rehfeld 1998).

Neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems

Epidemiologie

Neuroendokrine gastroenteropankreatische Tumoren (GEP-NETs) sind mit einem Anteil von 0,5-2% aller Neoplasien sehr selten. Früheren Untersuchungen zufolge liegt die Inzidenz bei <2/100000 Einwohner/Jahr (Buchanan, Johnston et al. 1986), jüngere post-mortem-Untersuchungen gehen nun von 2,5-5/100000 aus (Modlin, Oberg et al. 2008). GEP-NET's verursachen die meisten aller endokrin aktiven Erkrankungen des GI-Traktes, machen aber nur ca. 2% aller malignen gastrointestinalen Neoplasien aus.

Ätiopathogenese

Über die Ätiologie und Pathogenese der GEP-NET's ist bislang wenig bekannt (Rindi, Candusso et al. 1999). Pearse und Polak stellten anhand von histochemischen Untersuchungen die Hypothese auf, dass alle neuroendokrinen Zellen des GI-Traktes, die sie dem „APUD-Zellsystem“ zuordneten, neuroektodermalen Ursprungs seien und in den Darm migrierten (Pearse and Polak 1971). Sie nahmen an, dass Zellen mit gleichen morphologischen und histochemischen Eigenschaften eine gemeinsame Histogenese zugrunde liegen müsste. In embryologischen Studien zeigte sich jedoch,

dass die meisten Zellen neuroendokriner Tumoren endodermalen Ursprungs sind (Le Douarin and Teillet 1973; Cox and Pierce 1982). Mehr als 90% der GEP-NET treten sporadisch auf. Nur bei einer Minderheit der Fälle treten GEP-NET im Rahmen von komplexen familiären endokrinen Syndromen auf wie z.B. MEN1, MEN2 (Duh, Hybarger et al. 1987), Neurofibromatose von Recklinghausen, von Hippel-Lindau-Erkrankung (Griffiths, Williams et al. 1987). Bei sporadischen Mitteldarm-NET ist eine häufige Deletion auf dem Chromosom 18 beschrieben (Lollgen, Hessman et al. 2001). Zhao et al. vermuten, dass den Vorder- und Mitteldarm-NET verschiedene Entstehungswege zugrunde liegen (Zhao, de Krijger et al. 2000).

Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass GEP-NET weder übliche gemeinsame Onkogene wie *src*, *ras*, *myc*, *fos*, noch Tumorsuppressorgene wie *p53* exprimieren (O'Dowd and Gosney 1995; Wang, Johnston et al. 1995; Lee 1996; Rindi, Villanacci et al. 2000; Grabowski, Schrader et al. 2008). Verschiedene genetische Untersuchungen an neuroendokrinen Tumoren lassen für hochmaligne neuroendokrine Karzinome einen mit den konventionellen kolorektalen Karzinomen ähnlichen und teils gemeinsamen Transformationsweg vermuten, während die Pathogenese der niedrigmalignen GEP-NET eine grundsätzlich andere zu sein scheint. Einige Autoren sehen dies in der Abstammung der Tumorguppen von unterschiedlichen Ursprungszellen begründet: Benigne neuroendokrine Tumoren und niedrig-maligne neuroendokrine Karzinome entwickeln sich demzufolge aus orthotopen neuroendokrinen Zellen des Epithels nach Schädigung von teilweise differenzierten Vorläuferzellen (Mills, Allen et al. 1983; Bosman 1997), während der Ursprung der hochmalignen neuroendokrinen Karzinome in einer entarteten Stammzelle vermutet wird (Helpap and Kollermann 1999). Durch immunhistologische Bestimmungen der Wachstumsfraktion, von CgA und Synaptophysin an Tumoren diverser Organe konnte zudem gezeigt werden, dass es keine Tumorprogression von Karzinoiden über niedrigmaligne neuroendokrine Karzinome zu hochmalignen Karzinomen zu geben scheint (Sampietro, Tomasic et al. 2000; Helpap and Kollermann 2001). Undifferenzierte neuroendokrine Karzinome sind nahezu in der Hälfte der Fälle mit villösen Adenomen, Adenokarzinomen oder adenokarzinomatösen Elementen assoziiert, wobei Übergangszonen fehlen (Mills, Allen et al. 1983; Chen 1989; Fenoglio-Preiser 2001; Brenner, Tang et al. 2004). Genetische Untersuchungen von synchron aufgetretenen kleinzelligen neuroendokrinen Karzinomen und assoziierten Adenokarzinomen oder tubulovillösen Adenomen im Kolorektum zeigten identische genetische Alterationen in beiden Tumorkomponenten:

Ein Verlust der Heterozygotie (LOH) für p53 (Ubiali, Benetti et al. 2001; Dacic, Finkelstein et al. 2002), DCC und APC-Tumor-Suppressorgene (Vortmeyer, Lubensky et al. 1997; Huang, Behrens et al. 2002), Bcl-2 (Latulippe, Klimstra et al. 2001) und den Rb-Genlocus (Huang, Behrens et al. 2002) sowie eine Kras-Mutation (Huang, Behrens et al. 2002). Keine dieser Abnormalitäten ließ sich bei gut differenzierten neuroendokrinen Tumoren nachweisen (Vortmeyer, Lubensky et al. 1997).

Zusammenfassend legen die beispielhaft zitierten Studien nahe, dass der Entstehung von hochmalignen neuroendokrinen Karzinomen und wenig differenzierten Adenokarzinomen z.T. die gleichen Veränderungen der Adenom-Karzinom-Sequenz zugrunde liegen. Außerdem ist eine Abstammung von derselben Stammzelle anzunehmen, während den gut differenzierten neuroendokrinen Tumoren und Karzinomen eine grundlegend andere Pathogenese zugeordnet wird.

Diagnostik

Der Nachweis der neuroendokrinen Differenzierung durch unspezifische Sekretionsprodukte

Bestimmte Proteine werden von neuronalen und neuroendokrinen Zellen exprimiert. Da sie von der zellspezifischen Hormonproduktion unabhängig sind, also auch bei klinisch und laborchemisch hormoninaktiven Tumoren meist erhöht sind, können sie in der Diagnostik der GEP-NET als generelle Marker (Breitspektrummarker oder panneuroendokrine Marker) für die neuroendokrine Differenzierung genutzt werden (Heitz, Roth et al. 1991; Polak, 1993; (Wiedenmann and Huttner 1989).

Das Glykoprotein Chromogranin A, bestehend aus 10 Paaren basischer Aminosäuren, (Stridsberg, Oberg et al. 1995; Nobels, Kwekkeboom et al. 1998) gehört einer Gruppe von löslichen Proteinen an, die in der Matrix von sekretorischen Granula fast aller neuroendokriner Zellen lokalisiert sind (Lloyd, Mervak et al. 1984; Rindi, Buffa et al. 1986; Weiler, Fischer-Colbrie et al. 1988). CgA befindet sich außerdem mit den Katecholaminen in den chromaffinen Granula des Nebennierenmarks und sympathischen Nerven (Mori, Mimori et al. 1995) Die Funktion von CgA ist bislang unbekannt. Synaptophysin ist ein vesikuläres Membranglykoprotein, das unabhängig von anderen neuroendokrinen Markern, z.B. den Produkten der sekretorischen Granula, produziert wird (Wiedenmann, Franke et al. 1986; Buffa, Rindi et al. 1987; Wiedenmann and Huttner 1989). Synaptophysin kommt beim Menschen in jeder Nervenzelle, in den Inselzellen, in neuroendokrinen Zellen des Bronchial- und Gastrointestinaltrakts und in

Synapsen vor. Die Neuronen-spezifische Enolase (NSE) ist die neuronale Form des glykolytischen Enzyms Enolase. Die Reaktivität von NSE ist unabhängig vom Inhalt der sekretorischen Granula. Seine geringe Spezifität von nur 58-72% durch das gleichzeitige Vorkommen in zahlreichen non-neuroendokrinen Tumoren wie dem papillären Pankreaskarzinom (Chott, Kloppel et al. 1987) und bei Nierenerkrankungen lässt es als Marker für die neuroendokrine Differenzierung eines GEP-NET nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Der Nachweis der Funktionalität des Tumors durch eine vermehrte zellspezifische Hormonproduktion

Man unterscheidet funktionelle (=hormonproduzierende und -sezernierende) von non-funktionellen Tumoren. Zellspezifische Marker der normalen sowie der neoplastischen neuroendokrinen Zellen sind die Hormone, die im gastroenteropankreatischen System vorkommen: pankreatisches Polypeptid, vasoaktives intestinales Polypeptid, Insulin, Glukagon, Gastrin und andere. Funktionalität bedeutet nicht lediglich den (immunhistologischen) Nachweis eines spezifischen Sekretionsproduktes (z.B: Gastrinexpression) am Präparat, sondern eine sicher pathologische Erhöhung des entsprechenden Neurotransmitters im Serum mit entsprechender klinischer Symptomatik.

Therapie

Therapiestrategien

Zu den Therapiestrategien zählen die kurative und palliative chirurgische Therapie, die Biotherapie, systemische Chemotherapie, lokale interventionelle Therapieverfahren und die Radiorezeptortherapie (siehe Tab. 1). Nur bei weniger als einem Drittel aller Neumanifestationen eines NET ist eine kurative chirurgische oder endoskopische Tumorresektion möglich, da der Tumor bei 60-70% der Patienten bei Diagnosestellung bereits hepatisch metastasiert ist (Panzuto, Nasoni et al. 2005) Aufgrund des langsamen Tumorwachstums sind oft auch wiederholte palliative chirurgische Interventionen (Tumordebulking, Entfernung symptomatischer Metastasen, Leberresektion, Beseitigung chronischer Darmpassagestörungen etc.) indiziert (Hill, McPhee et al. 2009). Die *symptomatische Therapie* der Wahl beim metastasierten, funktionell aktiven GEP-NET ist die Biotherapie durch Anwendung langwirksamer Somatostatinanaloga zur Hemmung der Tumorphormonfreisetzung (Oberg, Kvols et al.

2004). Eine systemische Chemotherapie meist aus einem Platinpräparat (Cis- oder Carboplatin) und Etoposid erbringt Studien zufolge nur bei schnellwachsenden kleinzelligen PDEC einen Erfolg (Moertel, Kvols et al. 1991; O'Toole, Hentic et al. 2004). Nur die WDEC des Vorderdarms sprechen auf eine Polychemotherapie mit Streptozotocin und 5-FU oder Doxorubicin als Standard an (Sun, Lipsitz et al. 2005), Rektum- und Dünndarm-NET sind kaum chemosensibel (Oberge 2001). Lokale Therapieverfahren (thermisch-ablativ oder Embolisation) führen zu einer Verlängerung der Überlebenszeit und Verbesserung der Lebensqualität durch Reduktion der Tumorlast beim hepatisch metastasierten GEP-NET (Vogl, Naguib et al. 2009) Bei den *thermischen Therapieverfahren* wird die Radiofrequenzablation am häufigsten angewandt. Die RFA ist nur indiziert bei wenigen, <5 cm großen Metastasen der Leber (Livraghi, Goldberg et al. 2000). Zu den *Embolisationsverfahren* gehören die Transarterielle Chemoembolisation (TACE), selektive interne Strahlentherapie (SIRT) und die Pfortaderembolisation (PFA). Die Embolisationsverfahren sind den thermischen Verfahren überlegen, wenn sehr viele und/oder sehr große Herde vorhanden sind (Steinmüller, Kianmanesh et al. 2008): Die SIRT wird bei einer multilokulären Metastasierung bevorzugt. Die PFA wird bei einem isolierten unilateralen Leberbefall zur Induktion einer Hypertrophie der nicht-befallenen Restleber angewendet, um die Voraussetzung zu einer erweiterten Leberresektion als R0-Resektion zu schaffen. Die Expression von SSR durch GEP-NET bildet die Grundlage der Radiorezeptortherapie oder Peptidrezeptor-vermittelten Radionuklidtherapie (PRRT) mit guter klinischer Wirksamkeit (Kwekkeboom, Teunissen et al. 2005). Bei der PRRT bindet ein über einen Chelator (=DOTA) an ein Radionuklid (90Yttrium, 177Lutetium) gekoppeltes Somatostatin-Analogon (Octreotate=DOTA-TATE oder Tyrosin-Octreotid=DOTA-TOC) an die SSR des Tumors. Bei den neuen sogenannten „molekularen Therapien“, die erst kürzlich Eingang in die Therapie von GEP-NET fanden, werden Substanzen eingesetzt, die gezielt an verschiedenen Signalübertragungstoffen mit Einfluss auf Progression und/oder Symptomatik wirksam werden.

Magen	Typ 1 und 2	< 1 cm	keine Therapie, aber jährliche endoskopische Verlaufskontrolle
		>1 cm, bis zu 6 Tumoren, keine Infiltration	endoskopische Resektion
		> 1 cm, > 6 Tumoren, Infiltratives Wachstum (bis in Tunica muscularis propria)	lokale chirurgische Resektion
	alle übrigen Fälle und Typ 3		partielle oder totale Gastrektomie
	<i>schlecht-differenzierte</i> Tumore		Cisplatin/Carboplatin und Etoposid
Duodenum und Pankreas	<i>gut differenzierte</i> nicht-funktionelle Tumore des Duodenum	< 1cm	endoskopische Resektion, (nur bei <i>periampullärer Lokalisation</i> : lokale chirurgische Resektion)
		1-2 cm	keine gesicherte Therapie
		<2cm mit Lymphknotenmetastasen oder >2 cm	<u>OP je nach Lokalisation</u> : lokale Resektion, Duodenektomie oder Pankreatikoduodenektomie
	<i>schlecht-differenzierte</i> nicht-funktionelle Tumore des Duodenum		<u>OP je nach Lokalisation</u> : Duodenektomie oder Pankreatikoduodenektomie, Cisplatin/Carboplatin und Etoposid
	Gastrinome (G.)	kleine G. des Duodenums	Duodenotomie (je nach Lage ggf. auch Pankreatikoduodenektomie)
		größere (oder multiple) G. des Duodenums	Duodenektomie oder Resektion nach Whipple.
		Pankreaskopf	Enukleation oder Resektion nach Whipple
		Pankreasschwanz	distale Pankreatektomie mit Lymphknotenexploration.
		Therapie fortgeschrittener/inoperabler G.	-zytoreduktive Chirurgie -RFA einzelner Metastasen -Chemotherapie (STZ, 5-FU, Dox) -Biotherapie -bei positivem SSRT: PRRT
	Insulinome (I.)	< 2 cm	Enukleation
		>2 cm/ Enukleation nicht möglich	zentrale oder distale Pankreatektomie
		persistierende Hyperinsulinämie	Diazoxid, SSA , Glukokortikoide falls therapierefraktär
		maligne I.	Operation nach onkologischen Kriterien, <u>palliativ</u> : RFA, Kyptherapie, Chemoembolisation, PRRT, Chemotherapie (STZ, Dox)

Tabelle 1:
Therapierichtlinien für GEP-NET gemäß ENETS

Duodenum und Pankreas	VIPome, Glukagonome Somatostinome		Operation nach onkologischen Kriterien(mit Lymphadenektomie) SSA (v.a. bei VIPom und Somatostinom), palliativ: Chemotherapie (5-FU/Dox), ggf. PRRT)
	Nonfunktionelle <i>gut differenzierte</i> NET des Pankreas	<2 cm	keine gesicherte Therapie, ggf. Enukleation
		>2 cm	<u>OP nach Lage: Pankreaskopf:</u> Pankreatikoduodenotomie, <u>Pankreaskorpus:</u> mittlere Pankreatektomie
		MEN	kein gesichertes Therapieregime; palliativ: OP in spezialisierten Zentren, ggf. TACE , RFA
		bei deutlichem Progress	SSA , PRRT, molekulare Therapie, <u>wenn erfolglos:</u> STZ/5-FU oder Dox; schnell progrediente Tumoren: Cisplatin/Etoposid;
<i>schlecht differenzierte</i> NET des Pankreas		<u>OP nach Lage:</u> Pankreasteilresektion oder Pankreatikoduodenektomie ; Cisplatin/Etoposid	
Jejunum, Ileum,	funktionelle NET(Karzinoid-Syndrom)	SSA (2.Wahl: Interferone)	Segmentresektion mit Lymphadenektomie, palliative Resektion des Primärtumors immer, auch bei ausgedehnter Metastasierung,zur Vermeidung einer akuten Obstruktion
	Nonfunktionelle NET		
Appendix	< 2 cm		Appendektomie
	< 2 cm mit Infiltration der Mesoappendix oder R1-Resektion oder >2cm		Hemikolektomie rechts mit Lymphknotenexploration
Kolon, Rektum	benigne mukosale Tumoren, <1 cm, keine Infiltration der Submukosa, hochgradig differenziert		endoskopische Resektion
	1-2cm		endoskopische oder chirurgische Resektion (kein gesichertes Verfahren)
	alle übrigen Fälle		Operation nach onkologischen Kriterien
<i>schlecht differenzierte</i> neuroendokrine Karzinome von hinterem Jejunum, Ileum, Appendix, Zökum, Kolon, Rektum	keine oder nur regionale Lymphknotenmetastasen vorhanden		radikale OP nach onkologischen Kriterien
	Fernmetastasen vorhanden		Chemotherapie mit Cisplatin und Etoposid

Fortsetzung von Tabelle 1:
Therapierichtlinien für GEP-NET gemäß ENETS

Klassifikation und Prognose

Klassifikation

1907 wurde der Begriff „Karzinoid“ von Obernhof eingeführt (Obernhof 1907). Er fasste damit eine Gruppe von Tumoren des Ileums mit unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften zusammen, die sich weniger aggressiv verhielten als konventionelle Karzinome der gleichen Lokalisation. 1963 unterteilten Williams und Sandler die endokrinen Darmtumoren in Vorderdarm- (Magen, Pankreas, Duodenum und oberes Jejunum), Mitteldarm- (hinteres Jejunum, Ileum, Appendix, Zökum) und Enddarm- (Kolon und Rektum) -Tumoren (Williams and Sandler 1963). Diese Einteilung nur nach embryogenetischen Gesichtspunkten wurde der biologischen Vielfalt dieser Tumoren nicht gerecht. 1980 verwendete die erste „WHO-Klassifikation der endokrinen Tumoren“ die Bezeichnung „Karzinoid“ für alle Tumoren des diffusen neuroendokrinen Systems. Davon ausgenommen waren die endokrinen Tumoren des Pankreas (Insulinome), medulläre Schilddrüsenkarzinome, Paragangliome, kleinzellige Bronchialkarzinome und Merkel-Zell-Tumoren der Haut. Da auch diese Klassifikation hinsichtlich der biologischen Unterschiede der Tumorentitäten zu ungenau war, wurde sie in der Zwischenzeit zweimal revidiert. Die genaue Prognose bei Patienten mit gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren blieb eine schwierige Aufgabe für Kliniker und Pathologen, da sogar in der Gruppe der Patienten mit Fernmetastasen der klinische Verlauf stark variiert. 1995 wurde die für die Prognose der GEP-NET zunächst brauchbarste Klassifikation publiziert (Capella, Heitz et al. 1995). Dieses Klassifikationssystem berücksichtigt neben den histopathologischen Kriterien Tumorgöße, Angioinvasion und Infiltrationstiefe auch die Tumoralokalisation, die hormonelle Aktivität sowie die Assoziation mit bestimmten klinischen Syndromen. Auf der Grundlage dieser Kriterien wurden die neuroendokrinen Tumoren jedweder Lage als benigne, semimaligne, niedrigmaligne oder hochmaligne eingestuft. 2000 wurde diese revidierte Klassifikation in die zweite Fassung der „WHO-Klassifikation der endokrinen Tumoren des Gastrointestinaltrakts“ aufgenommen. Hier werden fünf Kategorien unterschieden, einschließlich der „reinen“ endokrinen Tumoren, gemischt exokrin-endokrinen Tumoren und tumor-like lesions. Die Tumoren werden gemäß der Lokalisation und dem Typ der Ursprungszelle unterteilt; beides, pathologische (Tumorgöße, Mitosenzahl, histologische gesicherte Angioinvasion und Metastasen) und klinische Daten werden in einem lagespezifischen klinisch-pathologischen Korrelat

berücksichtigt. Ein einheitliches Klassifikationsschema wird für alle Lokalisationen benutzt. Es basiert auf drei Hauptkategorien (siehe Abb. 1): (i) hoch differenzierte neuroendokrine Tumoren, entweder mit benignem Verhalten (i.i) oder fraglicher Dignität – benigne oder niedrigmaligne, (ii) hoch differenzierte neuroendokrine Karzinome mit niedrigmalignem Verhalten, (iii) niedrig differenzierte neuroendokrine Karzinome mit hochmalignem Verhalten.

1a	Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor (NET)
1b	Hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom (NEC)
2	Niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom (PDEC)

Tabelle 2:
Risikostratifizierung der GEP-NET, WHO 2000

In Tabelle 3 wird die Klassifikation beispielhaft für neuroendokrine Pankreastumoren gezeigt:

WHO-Klasse	Dignität	Funktionalität
I Hoch differenzierter neuroendokriner Tumor (=WDET)	benignes Verhalten: beschränkt auf Pankreas, Größe <2 cm, nicht angioinvasiv, 2 Mitosen/HPF und 2% Ki-67 positive Zellen	funktionell <i>aktiv</i> : Insulinom
		funktionell <i>inaktiv</i>
	benignes oder niedrigmalignes Verhalten (=fragliche Dignität): beschränkt auf Pankreas, Größe 1-2 cm, >2 Mitosen/HPF, >2% Ki-67 positive Zellen oder angioinvasiv	funktionell <i>aktiv</i> : Gastrinom, Insulinom, VIPom, Glukagonom, Somatostatinom oder ektopisches hormonell induziertes Syndrom
		funktionell <i>inaktiv</i>
II Hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom (=WDEC)	niedrigmalignes Verhalten: Invasion angrenzender Organe und/oder Metastasen	funktionell <i>aktiv</i> : Gastrinom, Insulinom, Glukagonom, VIPom, Somatostatinom oder ektopisches hormonell induziertes Syndrom
		funktionell <i>inaktiv</i>
III Niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom (=PDEC)	hochmalignes Verhalten	

Tabelle 3 WHO-Klassifikation der neuroendokrinen Tumoren des Pankreas

2006 wurden von der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) ein Vorschlag für eine tumor-node-metastasis-(TNM)-Klassifikation und Grading zunächst für Vorderdarm-Tumoren entwickelt (Rindi, Kloppel et al. 2006), um zu einer genaueren Einschätzung der Prognose beizutragen (siehe Tab.4 und 5). Der TNM-Vorschlag orientierte sich zum einen an dem TNM-System solider Tumore der Organe des Vorderdarms und zum anderen an der WHO-Klassifikation, was das Grading anbelangt. Ein entsprechendes TNM-System für Tumoren des Mitteldarms und Hinterdarms wurde im Oktober 2007 veröffentlicht (Rindi, Kloppel et al. 2007). In den Tab. 2 und 3 wird das TNM-System exemplarisch für Tumore des Pankreas und des Ileums dargestellt. Die durch die ENETS erarbeiteten TNM-Klassifikationen standen zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchung noch nicht zur Verfügung. Seit 2010 ist die 7. Auflage der neuen TNM-Klassifikation bindend (Wittekind, Bertolini et al 2010).

T= Primär- tumor (PT)	Tx	PT kann nicht bestimmt werden		
	T0	Kein PT vorhanden		
	T1	PT auf das Pankreas begrenzt und >2 cm		
	T2	PT auf das Pankreas begrenzt und >2-4cm		
	T3	PT auf das Pankreas begrenzt und >4 cm oder Infiltration von Duodenum oder Gallengang		
	T4	Tumor infiltriert Nachbarorgane (Magen, Milz, Kolon, Nebenniere) oder die Wand großer Gefäße (Truncus coeliacus/A. mesenterica superior)		
		Für jedes T (m) zufügen bei multiplen Tumoren		
N= Regionäre Lymphknoten- metastasen	Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht bestimmt werden		
	N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen		
	N1	regionäre Lymphknotenmetastasen		
M= Fernmetastasen	Mx	Fernmetastasen können nicht bestimmt werden		
	M0	Keine Fernmetastasen		
	M1	Fernmetastasen		
Krankheitsstadien	I	T1	N0	M0
	IIa	T2	N0	M0
	IIb	T3	N0	M0
	IIIa	T4	N0	M0
	IIIb	Jedes T	N1	M0
	IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 4 :
TNM-Klassifikation der NET des Pankreas

T= Primär- tumor (PT)	Tx	PT kann nicht bestimmt werden		
	T0	Kein PT vorhanden		
	T1	Tumor infiltriert Lamina propria oder Submucosa und <1cm		
	T2	Tumor infiltriert Muskularis propria oder >1cm		
	T3	Tumor infiltriert Pankreas oder Retroperitoneum		
	T4	Tumor infiltriert Peritoneum oder andere Organe		
		Für jedes T (m) zufügen bei multiplen Tumoren		
N= Regionäre Lymphknotenmetastasen	Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht bestimmt werden		
	N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen		
	N1	regionäre Lymphknotenmetastasen		
M= Fernmetastasen	Mx	Fernmetastasen können nicht bestimmt werden		
		Keine Fernmetastasen		
		Fernmetastasen		
Krankheitsstadien	I	T1	N0	M0
	IIa	T2	N0	M0
	IIb	T3	N0	M0
	IIIa	T4	N0	M0
	IIIb	Jedes T	N1	M0
	IV	Jedes T	Jedes N	M1

Tabelle 5 TNM-Klassifikation der NET des Duodenum und proximalen Jejunum

Prognose

Die 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) aller Patienten mit GEP-NET variiert stark zwischen 6% (Saclarides, Szeluga et al. 1994) und 100% (Moertel, Weiland et al. 1987), je nach den vorangestellten Indikatoren wie histologischer Subtyp, Angioinvasion, Tumorgöße etc. Der Nachteil der aktuellen Klassifikation ist, dass es innerhalb der großen WHO-Klasse II der „hoch differenzierten endokrinen Tumoren mit benignem Verhalten oder fraglicher Dignität“ nicht möglich ist zu unterscheiden, welche der Patienten in den darauffolgenden Jahren Metastasen entwickeln werden, an der Erkrankung sterben oder durch eine konventionelle Therapie geheilt werden können. Das gleiche Problem stellt sich auch bei den Patienten mit neuroendokrinen Tumoren unbekanntem Ursprungs. In diesen Fällen von Metastasierung besteht der Nachteil der Klassifikation darin, dass es auch innerhalb der Gruppe „hoch differenzierte endokrine Karzinome mit niedrigmalignem Verhalten“ signifikante Unterschiede in der Überlebenszeit gibt.

Prognosefaktoren bei GEP-NET

Große Anstrengungen sind unternommen worden, um bei dieser speziellen Tumorentität Prognosefaktoren zu etablieren, mit deren Hilfe eine genauere Prognose der Überlebenszeit zu stellen ist. Eine Studie mit 56 niederländischen Patienten (Van Eeden, Quaedvlieg et al. 2002) hat beispielsweise die prognostische Bedeutung des immunhistochemischen Nachweises von verschiedenen *Markerproteinen* (Chromogranin A, Synaptophysin, Leu7/CD57, neural cell adhesion molecule (NCAM)/CD56, Zytokeratin 8, p53, Bcl-2, HER2/neu, Ki-67/MIB-1) und *klinischer Parameter* (Alter, Geschlecht, Urin-5-HIAA, Vorliegen des Karzinoid-Syndroms) evaluiert. Aus ihr resultiert, dass von den untersuchten Markern nur Synaptophysin, Zytokeratin 8 und Ki-67 (MIB-1) eine - eingeschränkte - prognostische Bedeutung hatten. Der einzige *klinische* Parameter mit einer ungünstigen prognostischen Bedeutung war ein Lebensalter über 60 Jahre, im Gegensatz zu den Ergebnissen einer anderen Studie (Onaitis, Kirshbom et al. 2000). Moyana und Kollegen (Moyana, Xiang et al. 2000) zeigten in einer Studie mit 58 Patienten mit gastrointestinalen Karzinoiden, dass Ki-67/MIB-1 und p53 als Prognosefaktoren das histologische Grading ergänzen, während der Nachweis von bcl-2 hierfür weniger nützlich erschien.

Ki-67 (MIB-1) als Proliferationsmarker

Der Antikörper Ki-67 demaskiert ein nukleäres Antigen, das während des Zellzyklus in der G1-, S-, G2- und M-Phase von normalen und neoplastischen menschlichen Zellen exprimiert wird, während ruhende Zellen (G0-Phase) dieses Antigen nicht exprimieren. Mithilfe der immunhistochemischen Darstellung vom Ki-67-Antigen kann, wie 1984 erstmals beschrieben (Gerdes, Lemke et al. 1984), die sog. „Wachstumsfraktion“ eines Gewebes markiert und anhand des prozentualen Anteils der Ki-67-positiven Zellen, der sogenannten „Proliferationsrate“, die Wachstumsgeschwindigkeit eines Gewebes bestimmt werden (Brown and Gatter 1990; Hall and Woods 1990). Durch diese Eigenschaften wird der Nachweis von Ki-67 bei verschiedenen Tumorentitäten (Hodentumoren, Mammatumoren) zur Abschätzung von Wachstumsgeschwindigkeit und Prognose routinemäßig geführt. Bei der WHO-Klassifikation der GEP-NET ist die Expression von Ki-67 ein Parameter der Dignität, der zur Einteilung in die drei WHO-Klassen und somit zur prognostischen Einschätzung herangezogen wird (siehe Tabelle 3). Es gibt verschiedene gegen das Antigen Ki-67 gerichtete Antikörper. Der von Gerdes und Kollegen beschriebene Antikörper-Klon Ki-67 funktionierte nur zuverlässig

an Kryostat-Schnitten, war also für die klinische Routine-Diagnostik ungeeignet. Der Antikörperklon MIB-1 war der erste Antikörper gegen Ki-67, der paraffingängig ist (Gerdes, Becker et al. 1992) und dadurch auch für retrospektive Untersuchungen wie die vorliegende verwendet werden kann.

Survivin

Survivin ist ein Mitglied der Familie von Apoptose-Inhibitor-Proteinen und wird während der embryonalen Entwicklung, in proliferierenden nicht-neoplastischen Zellen wie Kolon-Epithel, ösophagealem Plattenepithel, uteriner Zervix-Mukosa, sich regenerierenden Leberzellen und in malignen Zellen exprimiert. Survivin kommt eine duale Rolle als Regulator von Mitose und Apoptose zu:

Die starke Expression von Survivin in sich teilenden Zellen weist auf die Beteiligung von Survivin am Ablauf des **Zellzyklus** hin, die in zahlreichen Studien wiederholt gezeigt werden konnte (Altieri 2006): Wird die Survivin-Expression mit antisense-Strategien unterdrückt, sind eine Inhibition der Zellproliferation durch Dysregulation der Zentrosomen, Bildung von multipolaren Mitosespindeln, und Misslingen der Chromatidtrennung sowie Polyploidie und Multinukleation die Folge (Li, Ackermann et al. 1999; Beltrami, Plescia et al. 2004). In den letzten Jahren wurde bekannt, dass Survivin während der Mitose in zwei subzellulären Fraktionen lokalisiert ist: eine Fraktion von Survivin ist mit dem „inner centromere protein“ (INCENP), Aurora B und Borealin im sogenannten chromosomalen-passenger-Komplex (CPC) assoziiert. Dieser bindet erst an die Kinetochore und später an die Spindelfasern und ist somit wichtig für die Segregation der Chromosomen und die Zytokinese, indem er z.B. Fehler der Kinetochor-Bindung und die fehlerhafte Ausrichtung der Chromosomen korrigiert (Honda, Korner et al. 2003; Vagnarelli and Earnshaw 2004). Außerdem belegen Studien, dass eine zweite, vom CPC unabhängige Fraktion von Survivin direkt mit den Mikrotubuli assoziiert ist und die Stabilität der Mikrotubuli und Bildung der Mitosespindel reguliert (Rosa, Canovas et al. 2006).

Die Bedeutung von Survivin bei der Inhibition der **Apoptose** wurde in zahlreichen Studien belegt: Der Mangel von Survivin in transgenen Mäusen verstärkt die Fas-vermittelte Leber-Apoptose über mitochondriale Bahnen (Conway, Pollefeyt et al. 2002). Die Expression von Survivin und der Verlust von p53 verhindern die Apoptose von Keratinozyten als Antwort auf eine durch UV-B Licht entstandene DNA-Schädigung (Grossman, Kim et al. 2001).

Die Mechanismen, über die Survivin die Apoptose inhibiert, sind noch nicht abschließend geklärt. Die Gruppe um Suzuki zeigte, dass Survivin und CDK4-p21-Komplexe sich in den Zellkern von HEP G2-Zellen des hepatozellulären Karzinoms verlagern und p21 zur Bindung von Procaspase-3 frei setzen. Dadurch wird die Zellapoptose als Reaktion auf die Fas-Aktivierung verhindert (Suzuki, Ito et al. 2000). Neueren Untersuchungen zufolge soll Survivin nach einem Zelltodstimulus aus dem Mitochondrium in das Zytosol ausgeschüttet werden und über die Interaktion mit Cofaktoren (HBXIB, XIAP) Caspase-9 inhibieren (Dohi, Beltrami et al. 2004).

Survivin wird durch den Wildtyp p53 herunterreguliert (Mirza, McGuirk et al. 2002). Die Feinabstimmung der Wirkungen von Survivin scheint durch vier unterschiedliche unterschiedliche Spleiß-Varianten zu erfolgen: Survivin- Δ Ex3, Survivin-2B, Survivin-3B und Survivin-2 α , deren jeweilige Funktion noch nicht abschließend geklärt ist (De Maria, Pannone et al. 2009).

Die dargestellten Wirkmechanismen zeigen, wie die Expression von Survivin die Wachstumsfähigkeit der Tumorzellen erhöhen und die Tumorzellen befähigen kann, den zytotoxischen Effekten der Zytostatika zu widerstehen. Mehrere Studien haben gezeigt, dass das Vorhandensein von Survivin mit einer niedrigen Überlebenszeit von Patienten mit unterschiedlichen Tumoren assoziiert ist (Lei, Geng et al.; Tanaka, Iwamoto et al. 2000). Andere Studien lassen vermuten, dass nur die nukleäre Expression von Survivin mit dem Verlauf der Tumorerkrankung korreliert (Qi, Kudo et al.), während im Zytoplasma vorhandenes Survivin keine prognostische Bedeutung hat (Grabowski, Kuhnel et al. 2003).

Fragestellung

Die prognostische Bedeutung von Survivin bei gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren

Es wurde ein Patientenkollektiv von 89 Patienten mit Überlebensdaten von mindestens fünf Jahren mit GEP-NET unterschiedlicher histologischer Differenzierung und Lokalisation erstellt. Anhand klinischer Daten und dazugehöriger Tumorgewebe wurden folgende Aspekte untersucht:

1. Welchen Wert hinsichtlich der Prognose hat die WHO-Klassifikation beim vorliegenden Kollektiv?
2. Welchen prognostischen Wert hat der immunhistochemische Nachweis des in der Routinediagnostik verwendeten Proliferationsmarker Ki-67 (MIB-1) bei den GEP-NET?
3. Welche prognostische Bedeutung hat Survivin und dessen unterschiedliche subzelluläre Verteilung bei den GEP-NET?
4. Welche Korrelation besteht zwischen Ki-67 und Survivin bezüglich der prognostischen Aussagekraft bei GEP-NET?
5. Welche Subgruppen von Patienten können innerhalb der WHO-Klassen durch den Nachweis von Survivin identifiziert werden, für die aufgrund ihrer unterschiedlichen Prognose das Therapieregime künftig individualisiert werden sollte?

Material und Methoden

Grundlage der retrospektiven immunhistochemischen Untersuchung bildeten Tumorgewebe und klinische Daten von 89 Patienten mit einem histologisch gesicherten GEP-NET, die zwischen 1981 und 2001 in der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (69 Patienten), am Universitätsklinikum der Philipps-Universität Marburg (16 Patienten) oder am Universitätsklinikum Freiburg (4 Patienten) operiert wurden. Alle Patienten haben ihr schriftliches Einverständnis für die Durchführung dieser Untersuchungen gegeben.

Patienten

Eine Zusammenfassung der Patientendaten findet sich in Tab.6

Die Erstellung des Patientenkollektivs

Die infrage kommenden Patienten wurden mithilfe des Registers des Instituts für Pathologie der Charité (Campus Benjamin Franklin, CBF) ermittelt. Auswahlkriterium war ein in den Jahren 1981-2001 histologisch sicher diagnostizierter GEP-NET.

Die allgemeinen Patientendaten (Geschlecht, Alter), die Tumordaten (Lokalisation des Primärtumors, Histologie, Funktionalität, Größe, Metastasierungsgrad und Lokalisation der Metastasen), Therapiedaten (Resektion, zusätzliche Bio-, Chemo- und/oder Radiotherapie) und Nachsorgedaten (Tumorprogression, Rezidive, deren Therapie, Sterbedatum, Todesursache) wurden den Krankenakten entnommen. Die Daten wurden zum Teil durch Angaben der Hausärzte der Patienten und durch Erfragen von Sterbedaten beim Landeseinwohneramt Berlin ergänzt, so dass ein Follow-up aller Patienten über einen Zeitraum von mindestens fünf Jahren bzw. bis zu ihrem Tod erstellt werden konnte.

Patientenkollektiv

29 Patienten litten an einem hoch differenzierten neuroendokrinen Tumor, entweder mit benignem Verhalten oder fraglicher Dignität (well-differentiated endocrine tumor = WDET, WHO-Klasse I); 50 Patienten an einem hoch differenzierten endokrinen Karzinom mit niedrig malignem Verhalten (well-differentiated endocrine carcinoma = WDEC, WHO-Klasse II), 10 Patienten an einem niedrig differenzierten neuroendokrinen Karzinom (poorly-differentiated endocrine carcinoma = PDEC, WHO-Klasse III).

Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung war in allen drei Gruppen ähnlich (zwischen 50 und 60 Jahren).

In der Gruppe der 29 **WDET** waren 17 Frauen und 12 Männer. Die Primärlokalisationen der WDET waren in 15 Fällen der Vorderdarm (darunter 6 im Magen, 5 im Pankreas, 4 im Duodenum) in 9 Fällen der Mitteldarm (davon 4 im Ileum, 5 im Appendix) und in 5 Fällen im Hinterdarm (alle im Rektum). Von den 5 funktionellen Tumoren waren 4 Gastrinome, 1 funktioneller Tumor war im Rektum lokalisiert. Von den 29 Patienten mit WDET wurde in 25 Fällen der Tumor operativ, in 4 Fällen endoskopisch entfernt. Der Gruppe der 50 **WDEC** gehörten 23 Männer und 27 Frauen an. 35 von 50, also die meisten Tumoren dieser Gruppe waren im Mitteldarm lokalisiert, 32 davon im Ileum. Die 28 Patienten mit funktionellen Tumorerkrankungen litten an Tumoren des Ileums mit Lebermetastasierung (24 d.F.), des Pankreas (1 Patient), an Gastrinomen (2 d.F.) oder an einem VIPom.

Unter den 10 Patienten der Gruppe der **PDEC** waren 9 Männer und 1 Frau. Es handelte sich v.a. um Hinterdarntumore. Alle Tumore dieser Gruppe waren nicht-funktionell.

Bei allen 60 Patienten der WHO-Klassen II und III (**WDEC und PDEC**) kam es zur Fernmetastasierung, v.a. in die Leber. Andere häufige Lokalisationen waren Peritoneum, Gehirn und Lunge.

Parameter	WDET	WDEC	PDEC
n	29	50	10
Geschlecht	29	50	10
Männlich	12	23	9
weiblich	17	27	1
Alter (in Jahren)	29	50	10
Mittelwert	50	58,5	56
Altersverteilung	17-84	8-84	29-81
Lokalisation des Primärtumors	29	50	10
Vorderdarm	15	14	2
Magen	6	1	2
Pankreas	5	10	0
Duodenum	4	3	0
Mitteldarm	9	35	1
Ileum	4	32	0
Jejunum	0	1	0
Appendix	5	0	0
Zökum/Colon asc.	0	2	1
Hinterdarm	5	1	7
Kolon	0	0	3
Rektum	5	1	4
Funktionalität	25	38*	10
nonfunktionell	20	10	10
funktionell	5	28	0
Tumorgröße	29	28*	10
< 2cm	22	13	0
> 2cm	7	15	10
Lokalisation der Metastasen			
Leber	0	41	7
andere	0	28	5

Tabelle 6:
Klinisch-pathologische Daten aller 89 Patienten und Tumoren

Neben der Operation erhielten 37 der 50 Patienten mit Tumoren der WHO-Klasse II zusätzliche Therapien („Biotherapie“ mit Somatostatin und/oder Interferon- α oder Chemotherapie, siehe Tab. 7). Mehr als 90% des Tumormaterials, das in dieser Arbeit untersucht wurde, wurde allerdings vor den in Abb. 6 aufgeführten zusätzlichen Therapien entnommen.

Parameter	Patienten
	n
Gesamtzahl	50
Zusätzliche medikamentöse Behandlung	37
Somatostatin-Analoga	14
Interferon	3
Somatostatin+Interferon	5
Chemotherapie	2
Chemotherapie +Somatostatin	4
Chemotherapie +Interferon	1
Chemotherapie +Somatostatin+Interferon	1
Somatostatin+Radiatio	1
Radiatio+ Chemotherapie	3
Radioaktive Substanzen+Somatostatin+ Chemotherapie	1
Lokoregionale Chemotherapie +Somatostatin+Re-OP	1
Lokoregionale Chemotherapie + Chemotherapie Re-OP	1
Lokoregionale Chemotherapie +Somatostatin+Interferon	2

Tabelle 7

Zusätzliche nicht-chirurgische Behandlung von 37 Patienten (WDEC)

Material

Tumorgewebe

Es wurde formalinfixiertes in Paraffin eingebettetes Tumorgewebe verwendet. In einigen Fällen war nur entweder Material vom Primärtumor (57 Patienten) oder von Metastasen (15 Patienten) verfügbar; bei 17 Patienten war Material vom Primärtumor und Metastasen vorhanden. Anhand von Hämalaun- und Eosin- (HE-) gefärbten Schnitten der entsprechenden Tumoren wurden Grading und Tumordinfiltrationstiefe falls erforderlich ergänzt. Es wurden Paraffinblöcke ausgewählt, die gut morphologisch beurteilbar waren und neben neoplastischer auch gesunde Schleimhaut enthielten.

Kontrollen

Als Positivkontrolle für die immunhistochemischen Färbungen wurden Schnitte eines kolorektalen Karzinoms (mit bekannter Immunreaktivität für das gesuchte Antigen) verwendet. Als Negativkontrolle, d.h. als Spezifitätsüberprüfung der Antikörper, dienten Schnitte des oben beschriebenen Kollektivs, bei denen der Primärantikörper durch reinen Entwicklungspuffer ersetzt wurde.

Reagenzien der Immunhistochemie

Antikörper

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Antibody Diluent	DAKO ChemMate™, Hamburg, Code-No. S2022	
Polyklonaler Survivin-Rattenantikörper	(NOVUS Biologicals Inc, Littleton, CO, USA)	1:4000
Monoklonaler Ki-67-Antikörper (Klon MIB-1)	(DAKO Hamburg, Deutschland, Code No. N 1633)	1:2000
Chem Mate Detektionskit (POD/DAB) Chem Mate Detektionskit (APAAP/Red)	(DAKO Hamburg, Deutschland, No. K 5001) (DAKO Hamburg, Deutschland, No. K 5000)	

Tabelle 8 Verwendete Antikörper

Chemikalien

Survivin-Nachweis	Xylol, Ethanol, 30% H ₂ O ₂ EDTA-Puffer (1mM): Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS, 0,05M, pH 7,4 bis 7,6) DAB-Substratlösung (Sigma D 4413)
Ki-67-Nachweis	Xylol, Ethanol Zitratpuffer (pH 6): 2,1 g Zitronensäure-Monohydrat (Merck 5949) in 1l Aqua bidest TBS (0,05M, pH 7,4 bis 7,6)
Gegenfärben (Hämalaun)	1g Hämatoxylin (Merck 4305), 200 mg NaJO ₃ (Merck 6525), 50 g Kalialaun (Merck 507 A95744) in 1l Aqua bidest über Nacht gerührt und mit 50 g Chloralhydrat (Merck 2425) und 1 g Zitronensäure (Merck 244) versetzt
Kaisers Glyceringelatine	Merck 9242

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien

Methoden

Die Tumoren wurden dem immunhistochemischen Nachweis von zytoplasmatischem und nukleärem Survivin und Ki-67 unterzogen:

Der Immunhistochemische Nachweis von Survivin

Die Theorie der Avidin-Biotin-Methode

Die immunhistochemische Darstellung von Survivin erfolgte nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC) (Hsu 1990). Diese Methode gehört zu den modernen immunhistochemischen Färbemethoden, bei denen präformierte lösliche Enzym-anti-Enzym-Immunkomplexe aus Antigen (=Enzym) und den dagegen gerichteten Antikörpern verwendet werden. Die ABC-Methode basiert auf der natürlichen Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. Zunächst erfolgt die Inkubation mit einem spezifisch gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten Primärantikörper. Der Sekundärantikörper, der sich an den Primärantikörper binden kann, ist mit Biotin konjugiert. Die Biotinylierung ist ein im Vergleich zu anderen Konjugationsprozessen, die mit der Zerstörung von einzelnen Antikörpern und Markern einhergehen, schonender Vorgang, bei dem Biotin kovalent an den Antikörper gebunden wird. Das dritte Reagenz ist ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex. Die freien Stellen des Avidinmoleküls ermöglichen die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers. Letzterer muss nicht im Überschuss zugesetzt werden, da freie Fab-Arme zur Bindung nicht benötigt werden. Das zunächst

unsichtbare Enzym Peroxidase bildet in Anwesenheit eines Elektronendonors, des „Chromogens“, ein Enzym-Substratkomplex; anschließend erfolgt die Oxidation des Elektronendonors, der sich dadurch in ein gefärbtes und unlösliches Reaktionsprodukt umwandelt. Die im Gewebe bereits vorhandene endogene Peroxidaseaktivität muss vor Beginn der Anfärbung durch Zugabe eines Überschusses an H_2O_2 (bei Fehlen eines Elektronendonors) unterbunden werden, um eine unerwünschte unspezifische Farbreaktion zu vermeiden.

Trotz der Konjugation von Sekundär- und Tertiärantikörper, besitzt diese Methode aufgrund der stark ausgeprägten Affinität des Avidins zum Biotin gegenüber anderen direkten und indirekten Methoden eine höhere Sensitivität. Auch konnte eine gegenüber dem PAP- (Peroxidase-anti-Peroxidase) Verfahren überlegene Sensitivität gezeigt werden (Hsu, Raine et al. 1981).

Die Methode findet Anwendung bei der Identifizierung von Hypophysenhormonen, der Darstellung von Zelloberflächenmarkern, Lektinbindungsstellen, viralen Proteinen und Intermediärfilamenten.

Die Durchführung der Avidin-Biotin-Methode in der vorliegenden Untersuchung

Die Gewebeschnitte wurden auf Objektträger aufgetragen und über Nacht im Ofen bei einer Temperatur von $60^\circ C$ getrocknet. Nach der Entparaffinierung der Schnitte in Xylol und Rehydrierung mittels absteigender Alkoholreihe (jeweils 2 min in 100%igem, 96%igem, 80%igem, 70%igem Ethanol) folgten eine 5-minütige hitzeinduzierte Antigendemaskierung in 1mM EDTA-Puffer und eine 30-minütige Inkubation in 30%igem H_2O_2 zur Unterdrückung der endogenen Peroxidase-Aktivität. Dann wurden die Schnitte mit 0,25 $\mu g/ml$ anti-Survivin-Antikörper in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgten eine jeweils 30minütige Inkubation mit Biotin-konjugiertem anti-rabbit-Immunglobulin und dem Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex. Abschließend wurde eine 10minütige Inkubation in DAB-Substratlösung, eine einminütige Kernfärbung mit gereiftem Hämalaun und ein abschließendes Bläuen unter lauwarmen, fließenden H_2O durchgeführt.

Für die Spülung der Präparate zwischen den einzelnen Schritten und für die Antikörperverdünnung wurde 0.05 M Trisgepufferte Kochsalzlösung (TBS, pH 7.4 bis 7.6) verwendet. Zum Eindecken der gefärbten Präparate wurde Kaisers Glycerin-Gelatine verwendet.

Der immunhistochemische Nachweis von Ki-67

Die Theorie der Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase-Methode

Der immunhistochemische Nachweis von Ki-67 wurde mit der Alkalische Phosphatase-Antialkalische Phosphatase (APAAP)-Methode durchgeführt (Cordell, Falini et al. 1984). Wie die ABC-Methode gehört auch die APAAP-Methode zu den Enzym-anti-Enzymkomplex-Techniken. Das APAAP-Verfahren bietet eine gute Alternative zu Immunperoxidase-Färbungen bei der Darstellung von Strukturen, die einen hohen Anteil endogener Peroxidase enthalten.

Zunächst wird das Gewebsantigen mit Hilfe eines spezifischen Primärantikörpers identifiziert. Im Unterschied zum ABC-Verfahren bindet bei der APAAP-Methode an den Fab-Arm des Sekundärantikörpers ein mit zwei Molekülen alkalischer Phosphatase konjugierter Antikörper. Die Enzyme des APAAP-Komplexes hydrolysieren das Enzym Naphtholphosphat Ester (Substrat) zu Phenolkomponenten und Phosphaten. Die Phenole kuppeln mit farblosen Diazoniumsalzen und bilden so unlösliche Azofarbstoffe. Substrate sind z.B. verschiedene Naphthole, mögliche Chromogene Fast Red, Fast blue, Neufuchsin.

Durch wiederholte Applikation des Brückenantikörpers und APAAP-Komplexes gelangen zusätzliche Enzymmoleküle an die Anbindungsstelle und bewirken eine intensivere Farbreaktion. Ein getrennter Arbeitsschritt zur Unterdrückung der endogenen Aktivität der alkalischen Phosphatase (wie beim ABC-Verfahren im Falle der Peroxidase) ist nicht erforderlich, da das hierzu nötige Reagenz Levamisol in die Substratlösung pipettiert wird.

Die Durchführung der APPAP-Methode in der vorliegenden Untersuchung

Die Schnitte wurden in Xylol entparaffinisiert (20 Minuten) und anschließend in absteigender Alkoholreihe (jeweils 1-2 Minuten in 96%, 80% und 70%igem Alkohol) rehydriert. Zur thermischen Antigendemaskierung wurden die Präparate danach zwei Minuten unter Vakuum-Bedingungen in Zitratpuffer (pH 6) inkubiert. Nach dem Abkühlen im Zitratpuffer wurden die Präparate mit Aqua destillata gewaschen.

Die so vorbereiteten Präparate wurden 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem monoklonalen MIB-1-Antikörper (Verdünnung 1:2000) inkubiert. Im Anschluss daran erfolgten die Inkubationen mit dem im Kit enthaltenen sekundären Kaninchen-Anti-Maus-Immunglobulin und danach mit dem Alkalische-Phosphatase-Antialkalische-Phosphatase-(APAAP-)-Komplex für jeweils 30 Minuten. Die Inkubation mit

Brückenantikörper und APAAP-Komplex wurde mit einer Dauer von 10 Minuten wiederholt. Für die Entwicklung der Farbreaktion wurde dem im Kit enthaltenen Substratpuffer zunächst 1 Tropfen Levamisol/10 ml Substratpuffer zugesetzt. Dann wurde der Lösung jeweils im Verhältnis 1:250 Chromogen RED 1, 2 und 3 (Fast-RED-Chromogen) in genau dieser Reihenfolge zugegeben und gründlich gemischt. Die Lösung musste innerhalb von 20 Minuten verbraucht werden. Die Inkubation mit der so entstandenen Substratlösung erfolgte in der feuchten Kammer für 20 Minuten. Zuletzt wurde eine genau 1-minütige nukleäre Blaufärbung mit gereiftem Hämalaun durchgeführt und eine anschließende Bläuung unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten.

Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte eine Spülung der Präparate mit 0.05 M Tris-gepufferter Kochsalzlösung (pH 7.6).

Auswertung

Pro Präparat und Antikörper wurden in mindestens drei zufällig gewählten Gesichtsfeldern alle Tumorzellen ausgezählt und der Anteil der positiv markierten Tumorzellen an der Gesamtzahl der Tumorzellen dokumentiert. Aus diesem Verhältniswert wurde der Prozentwert für die mit dem jeweiligen Antikörper gefärbten Zellen errechnet.

Die Auswertung der Immunreaktivität wurde lichtmikroskopisch (Olympus BH2) in der Vergrößerung 1:100 und 1:400 vorgenommen. Dazu wurde das gesamte Präparat zunächst in der Vergrößerung 1:100 als Positivkontrolle auf mit dem neuroendokrinen Marker gefärbte gesunde Schleimhautzellen untersucht. Anschließend wurden mit dem Antikörper markierte neoplastische Zellen gesucht. Es wurden nur solche Zellen als positiv gewertet, die eine intensive Färbung mit dem jeweiligen Marker aufwiesen und welche sich eindeutig im Tumorareal befanden. Gefärbte Zellen, die nicht eindeutig zuzuordnen waren, wurden nicht berücksichtigt.

Die quantitative Auswertung wurde von zwei unabhängigen Untersuchern (Sonja Greshake und Patricia Grabowski) ohne Kenntnis der klinischen Daten vorgenommen. Gewebe wurde als „positiv“ bewertet, wenn mehr als 5% der Zellen mit dem anti-Survivin-Antikörper reagiert hatten, wie in der Literatur beschrieben (Kawasaki, Altieri et al. 1998; Grabowski, Kuhnel et al. 2003). Die Übereinstimmung zwischen den Auswertern lag bei über 90%; in Zweifelsfällen wurden die Schnitte mit Hilfe eines Pathologen überprüft.

Bei der Ki-67-Darstellung wurde der nukleäre Ki-67-Markierungsindex als der Prozentsatz gefärbter Zellen bezogen auf hundert Zellen in 10 high-power-fields (HPF) dargestellt. Wie bei der Survivin-Färbung wurde auch bei der Auswertung der Ki-67-Darstellung ein cut-off-Wert von 5% gefärbter Zellen gewählt (Moyana, Xiang et al. 2000).

Statistik

Zur Feststellung der Unabhängigkeit aller Parameter wurden univariate Analysen mit dem Cox-Regressionsmodell durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde mithilfe des Likelihood-Ratio-Test ermittelt.

Der Vergleich der Daten verschiedener Gruppen wurde bei voneinander unabhängigen Beobachtungseinheiten mit dem Mann-Whitney Test (Rangsummentest, Wilcoxon-Test für unabhängige Stichproben), bei paarigen Beobachtungen, d.h. bei abhängigen Beobachtungseinheiten mit dem CHI²-Test vorgenommen. Die meisten biologischen und pathologischen Variablen in der vorliegenden Untersuchung wurden einander jeweils paarig gegenübergestellt: Geschlecht, Alter (<58 Jahre versus >58 Jahre), Grading (G1-G2 versus G3), Tumgröße (<2 cm versus >2 cm), Funktionalitätsstatus (non-funktional versus funktional), positiver Nachweis des Ki-67-Antigens (<5% versus >5% der Zellen), Expression von Chromogranin A bzw. von Synaptophysin (vorhanden versus nicht vorhanden), immunhistochemischer Nachweis von zytoplasmatischem Survivin (ja versus nein) und nukleärem Survivin (<5% der versus >5% der Zellkerne gefärbt).

Die Gesamtüberlebensraten wurden mit Kaplan-Meier-Überlebenskurven (Produkt-Limit-Schätzer) erstellt, ausgehend von dem Zeitpunkt der Erstdiagnose. Die statistische Signifikanz der Unterschiede in der Überlebensrate wurde mit dem Mantel-Cox-Test (Log-Rank Test) berechnet. Unterschiede wurden als statistisch signifikant angesehen bei $p < 0,05$. Alle statistischen Analysen wurden mit SPSS® (Version 11.5, 2004, SPPS, Chicago) durchgeführt.

Ergebnisse

Die Expression und Lokalisation von Survivin in GEP-NET im gesamten Patientenkollektiv

In dieser Arbeit wurde die Expression von Survivin an Tumorgewebe von 89 Patienten untersucht (siehe Abb. 1): Da in 17 Fällen neben dem Präparat vom Primärtumor auch die zugehörige Metastase verfügbar war, umfasste das untersuchte Material insgesamt 74 Primärtumore und 32 Metastasen (lokoregionäre Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen in Leber, Peritoneum und Gehirn).

Der Survivin-Nachweis führte zu folgenden Färbeergebnissen:

- Die Färbung innerhalb eines Tumorgewebeschnittes war meist homogen.
- Bei 27 Tumoren wurde eine ausschließlich *zytoplasmatische* Färbung von Survivin beobachtet (s Abb. 1A).
- 10 Tumorpräparate zeigten eine *rein nukleäre* Färbung von Survivin (s. Abb. 1B).
- Ein gleichzeitiges Vorkommen von *zytoplasmatischem und nukleärem* Survivin wiesen 5 Tumore auf.
- Bei 47 der Tumore war Survivin negativ.
- Bei den 17 Fällen, in denen sowohl Primärtumor als auch Metastase vorhanden waren, war die Expression von Survivin bei Primärtumor und Metastase jeweils konkordant, d. h. entweder negativ, rein zytoplasmatisch oder rein nukleär.

Im Gegensatz dazu war die Survivinexpression in normaler Mukosa von Magen, Dün- und Dickdarm stets <5%, also definitionsgemäß negativ. Die Färbung war hier hauptsächlich zytoplasmatisch. Nur in der Tiefe der Krypten fanden sich einzelne nukleäre Färbungen. Die Art und Intensität der Färbung der normalen gastrointestinalen Mukosa war bei den unterschiedlichen Proben konsistent.

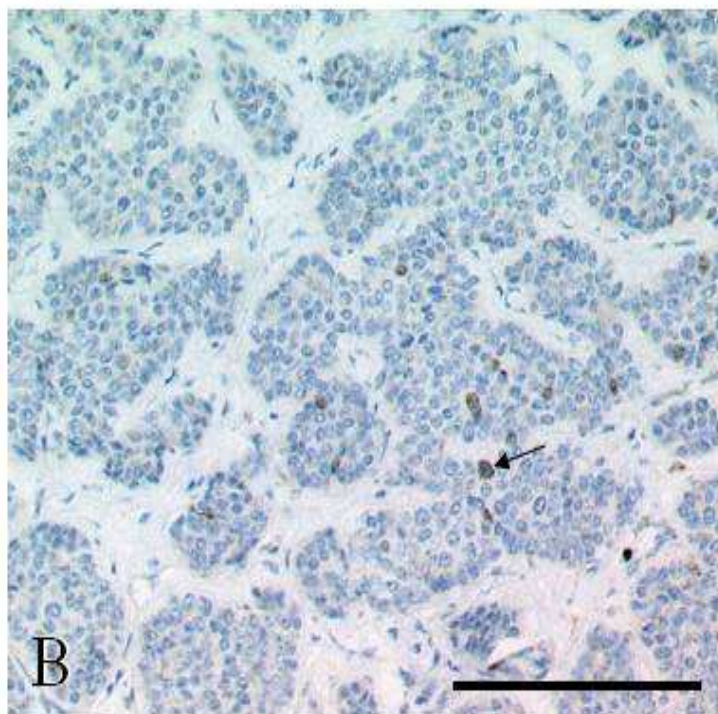
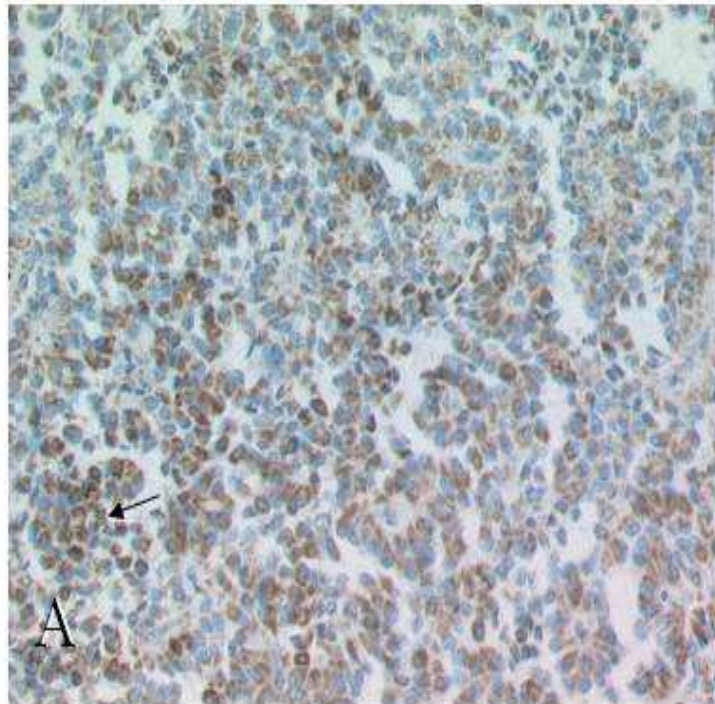


Abbildung 1: Die subzelluläre Lokalisation von Survivin bei zwei WDEC (WHO-Klasse II). Immunhistochemischer Nachweis von **zytoplasmatischem** Survivin (Braunfärbung des Zytoplasmas) **(A)**. Immunhistochemischer Nachweis von **nukleärem** Survivin (Braunfärbung der Zellkerne) **(B)**.

Die Expression und Lokalisation von Survivin, von Ki-67 und Prognose bei den nach WHO klassifizierten Tumoren

Lokalisierte GEP-NET: WDET (WHO-Klasse I)

29 von 89 Patienten wurden in dieser Untersuchung in die WHO-Klasse I eingeteilt. Obwohl einige dieser hoch differenzierten neuroendokrinen Tumoren gemäß der WHO der Gruppe der Tumoren mit „benignem Verhalten oder fraglicher Dignität“ zugeordnet worden waren, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass alle Tumoren dieser Gruppe mittels chirurgischer oder endoskopischer Resektion kurativ behandelt worden sind. Das komplette 5-Jahres-follow-up dieser 29 Patienten zeigt kein Rezidive oder tumorbedingte Todesfälle. Alle 29 Tumoren waren negativ (<5%) für Ki-67 (Abb. 2A) und nukleäres Survivin (Abb.2B). 11 Tumoren waren positiv für zytoplasmatisches Survivin.

Metastasierte GEP-NET:WDEC (WHO-Klasse II)

Bei 50 Patienten des Kollektivs lag die Diagnose „hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom“ (WHO-Klasse II) vor. Alle 50 Tumoren waren zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits metastasiert. Die Überlebenszeit der Patienten war sehr unterschiedlich. Die Expression und Lokalisation von Survivin war innerhalb dieser Gruppe heterogen: 5 Tumoren exprimierten nukleäres Survivin (10%), 1/5 davon sowohl nukleäres als auch für zytoplasmatisches Survivin. Eine ausschließlich zytoplasmatische Expression von Survivin wurde bei 16 Tumoren (32%) beobachtet. Bei 44/50 Fällen war zusätzlich der immunhistochemische Nachweis von Ki-67 möglich. 31 Tumoren waren negativ, 13 positiv für Ki-67. Bei 6 Präparaten war zu wenig Tumormaterial vorhanden, um beide Färbungen durchzuführen. Anschließend wurde die Ki-67-Expression mit der Expression von nukleärem Survivin in Korrelation gesetzt:

8 Tumoren in der Gruppe waren negativ für nukleäres Survivin (Abb. 2C), aber positiv für Ki-67 (Abb.2D). Die Überlebenszeit dieser 8 Patienten war bedeutend besser, als man nach dem alleinigen Nachweis von Ki-67 erwartet hätte.

Bei den übrigen Tumoren dieser Gruppe war der immunhistochemische Nachweis entweder gleichzeitig für beide Marker negativ oder positiv.

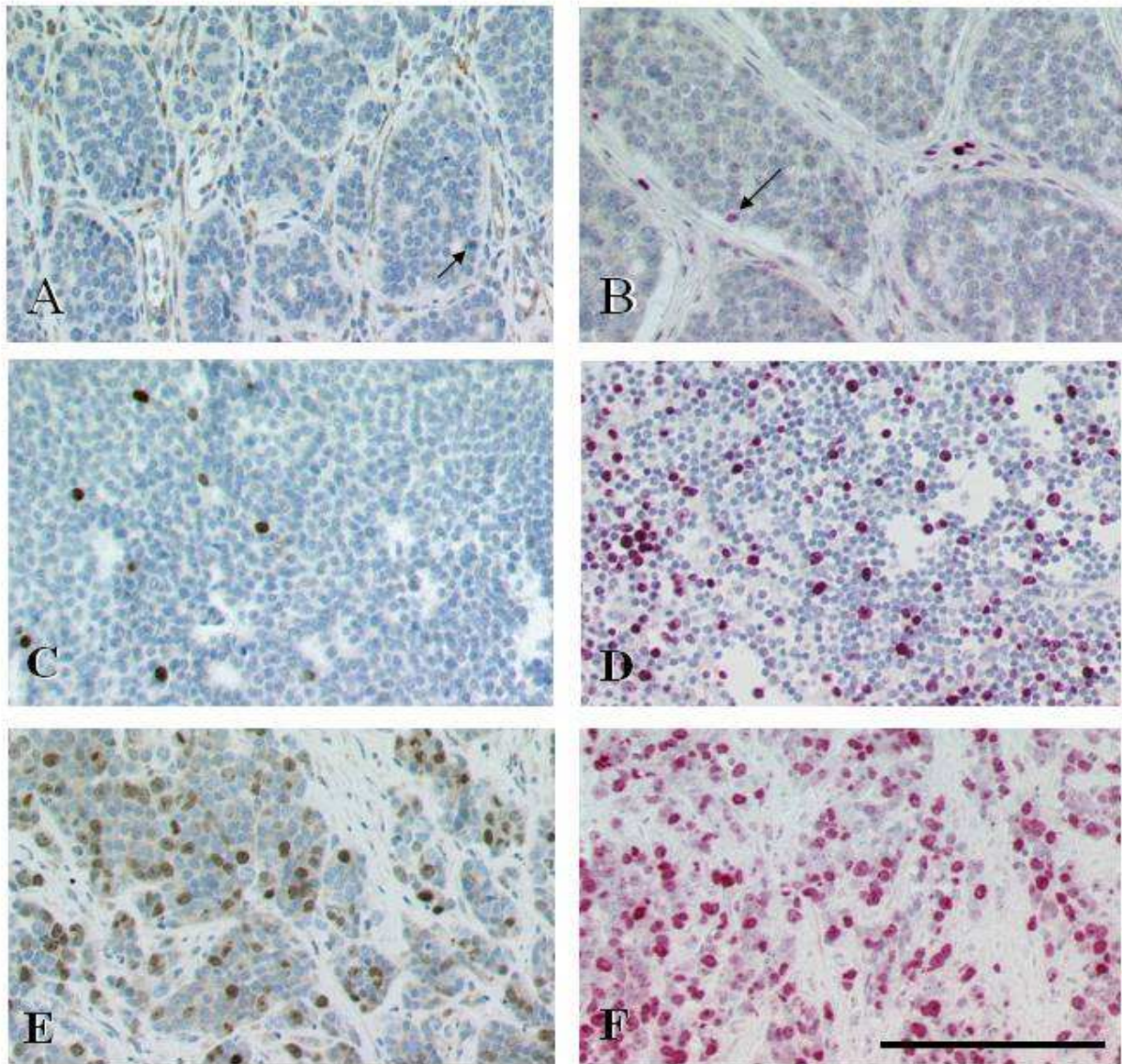


Abbildung .2:

Expression von nukleärem Survivin und Ki-67-Antigen bei paarenweisen Serienschnitten von GEP-NET.

Negative immunhistochemische Nachweise von nukleärem Survivin **(A)** (<1% der Zellkerne sind gefärbt) **und** von Ki-67 **(B)** (1% der Zellen sind gefärbt) bei einem WDET des Pankreas.

Negativer immunhistochemischer Nachweis von nukleärem Survivin **(C)** (<5% der Zellkerne sind gefärbt) bei **positivem** Ki-67-Nachweis **(D)** (5% der Zellen sind rot gefärbt) bei einem WDEC des Jejunums.

Positiver immunhistochemischer Nachweis von nukleärem Survivin **(E)** (40% der Zellkerne sind braun gefärbt) **und** von Ki-67 **(F)** (70-80% der Zellen sind rot gefärbt) bei einem PDEC des Magens.

Metastasierte GEP-NET: PDEC (WHO-Klasse III)

10 Patienten litten an hochmalignen, aggressiven, schlecht differenzierten neuroendokrinen Karzinomen. Alle Patienten dieser Gruppe wiesen eine ausgedehnte Fernmetastasierung und ein sehr limitiertes Überleben von durchschnittlich 13 Monaten auf.

In dieser Untergruppe des Kollektivs zeigten alle 10 Tumoren eine Expression von nukleärem Survivin (Abb. 2E). Zusätzlich waren 4 der 10 Tumoren positiv für zytoplasmatisches Survivin. Die Expression von Ki-67 (Abb. 2F) war in allen 10 Tumoren hoch (>20% der Tumorzellen).

Expression von Survivin			
Parameter	WHO-Klasse I (WDET)	WHO-Klasse II (WDEC)	WHO-Klasse III (PDEC)
n	29	50	10
zytoplasmatisch	11	16	4
nukleär	0	5	10
Expression von Ki-67			
Parameter	WHO-Klasse I (WDET)	WHO-Klasse II (WDEC)	WHO-Klasse III (PDEC)
n	29	44*	10
< 5%	29	31	0
5-15%	0	13	0
> 15%	0	0	10

Tabelle 10:

Übersicht der Nachweise von zytoplasmatischem und nukleärem Survivin und Ki-67 bei den in die drei WHO-Klassen eingeteilten Tumoren der vorliegenden Untersuchung

Die prognostische Bedeutung der Expression von Survivin in Korrelation mit Ki-67

Bei den 89 Patienten wurde anhand des jeweils kompletten 5-Jahres-follow-up die Überlebensrate statistisch errechnet (siehe Abb. 3). Wie gemäß der WHO-Einteilung zu erwarten, traten in der Gruppe der WDET (WHO-Klasse I) keine tumorbedingten Todesfälle oder Rezidive auf. In der Gruppe der PDEC (WHO-Klasse III) starben alle Patienten im untersuchten Zeitraum. Die durchschnittliche Überlebenszeit betrug 13 Monate.

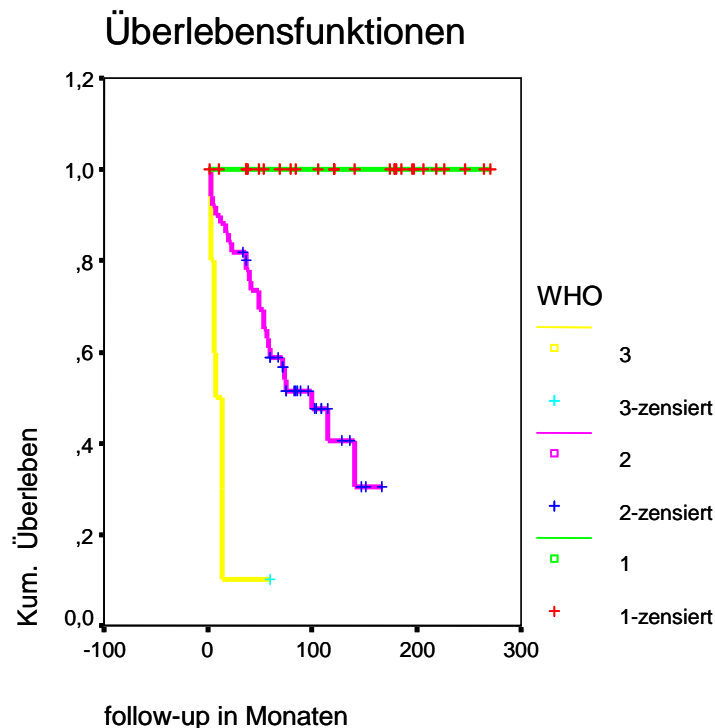


Abbildung 3

Kumulatives Überleben der in die drei WHO-Klassen eingeteilten GEP-NET. Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patienten mit WDET (WHO-Klasse I, n=29), WDEC (WHO-Klasse II, n=50) und PDEC (WHO-Klasse III, n=10). Die Unterschiede in der Überlebenszeit sind hochsignifikant ($p < 0,00001$).

In der Gruppe der WDEC (WHO-Klasse II) war das Ergebnis hingegen sehr heterogen: Obwohl bei Diagnosestellung alle Tumoren dieser Gruppe bereits metastasiert waren, gab es im 5-Jahres-follow-up erhebliche Unterschiede in der Überlebenszeit. Aufgrund der Heterogenität der WDEC sowohl bei der Überlebenszeit (Abb. 3), als auch bei der Expression von nukleärem Survivin (Tab. 10) wurde die Kaplan-Meier-Kurven für diese Patientengruppe in Abhängigkeit von der Expression nukleären Survivins errechnet (Abb. 4).

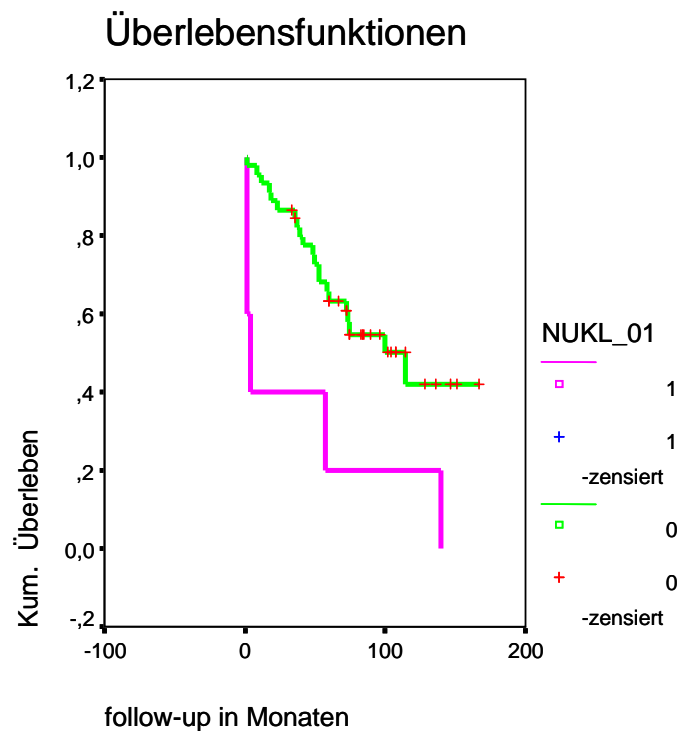


Abbildung 4:

Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Patienten mit WDEC in Relation zur Expression von nukleärem Survivin

Die mittlere Überlebenszeit der Patienten, deren WDEC nukleäres Survivin exprimierten), war mit 41 Monaten (Streuung 1-94 Monate; n=5) signifikant kürzer als die der Patienten, deren Tumore kein nukleäres Survivin exprimierten (103 Monate, Streuung 84-123 Monate; n=45; p=0,01, Mantel-Cox-Test/Log-Rank Test).

Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Kaplan-Meier-Überlebenskurven der gleichen Gruppe in der Ki-67-Expression (Ki-67 Antigen <5% versus Ki-67 Antigen >5%), nicht signifikant (durchschnittliche Überlebenszeit 96 Monate, Streuung 63-129 Monate, n=13, versus 93 Monate, Streuung 71-116 Monate, n=31; p=0,0637), siehe Abb.5.

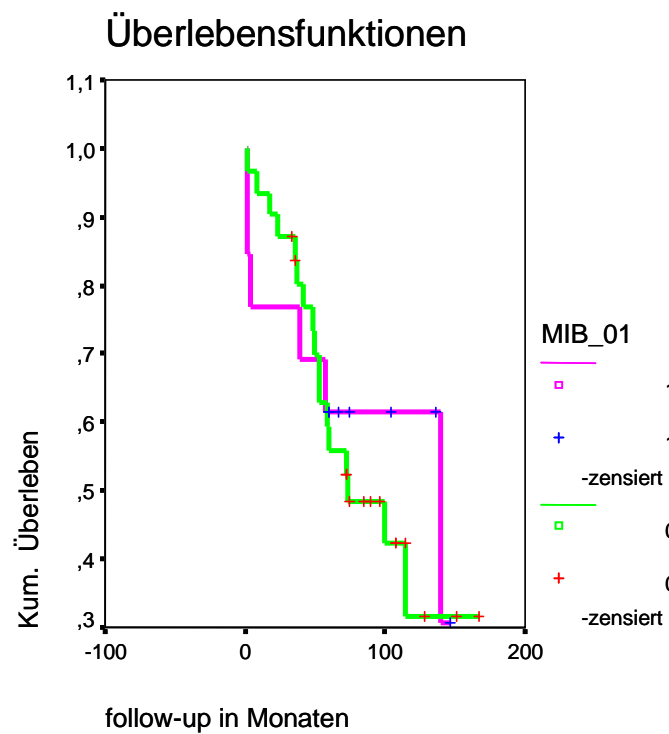


Abbildung 5:

Kaplan-Meier-Überlebenskurven der WDEC in Relation zur Expression von Ki-67

Interessanterweise zeigten bei der Kombination dieser beiden Variablen gegenüber den Patienten, deren Tumore positiv für ki67 *und* nukleäres Survivin waren die Kaplan-Meier Überlebenskurven der Patienten, deren Tumoren positiv für Ki-67 aber negativ für nukleäres Survivin waren, ein deutlich verbessertes Überleben ($p=0,0059$, siehe Abb.6). Nur ein Patient starb am Tumor, 7 von 8 Patienten überlebten:

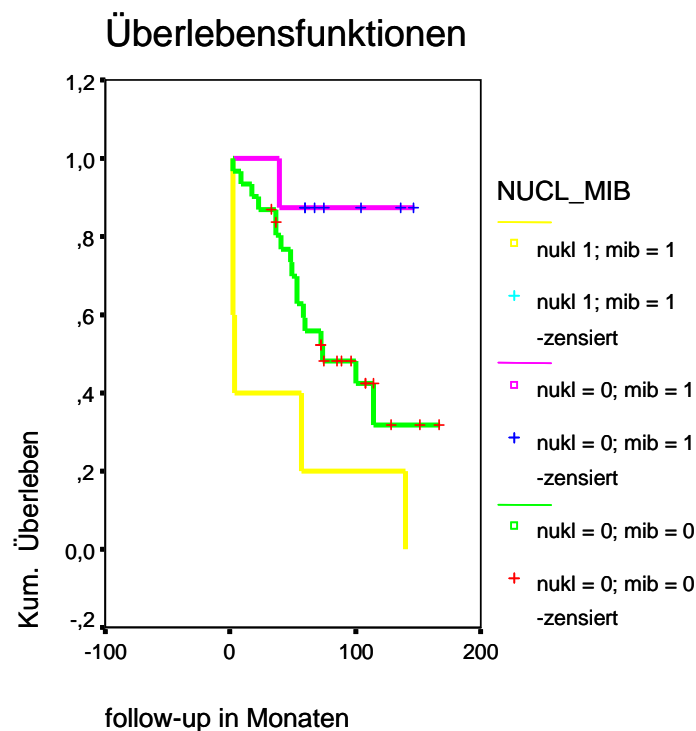


Abbildung 6:

Kaplan-Meier-Überlebenskurven der WDEC/Korrelation der Expression von nukleärem Survivin und Ki-67

Die univariate Analyse der Kohorte von Patienten mit WDEC (WHO-Klasse II) mit dem Cox-Regressionsmodell zeigte, dass die Gesamtüberlebensrate signifikant durch die Expression von nukleärem Survivin beeinflusst wurde, nicht jedoch durch andere klinisch-pathologische Parameter wie Alter, Geschlecht, Tumorgröße oder Funktionalität des Tumors.

Das relative Risiko für einen Patienten, am Tumor zu sterben, war bei Expression von nukleärem Survivin 4,56-fach erhöht (95% Konfidenzintervall 1,66-12,54). Da die Expression von nukleärem Survivin der einzige statistisch signifikante prognostische Marker in dieser Patientengruppe war, konnte eine Multivarianzanalyse nicht durchgeführt werden.

Im Gegensatz dazu hatte das zytoplasmatische Vorkommen von Survivin überhaupt keine prognostische Bedeutung.

Diskussion

Die prognostische Bedeutung von Survivin bei GEP-NET in der vorliegenden Untersuchung

Diese Untersuchung an Tumoren von 89 Patienten zeigt die Bedeutung von Survivin als prognostisches Markerprotein. Es wurde gezeigt, dass Patienten, deren Tumoren nukleäres Survivin exprimierten, eine signifikant kürzere Überlebenszeit hatten als die Patienten, deren Tumoren hierfür negativ waren (41 versus 103 Monate, $p=0,01$). Vor allem bei Tumoren der WHO-Klasse II, bei denen bislang eine Prognosestellung anhand gängiger Kriterien ungenau war, konnte in der vorliegenden Untersuchung erstmals durch Nachweis der Expression nukleären Survivins eine Subgruppe innerhalb der WHO-Klasse-II-Tumoren identifiziert werden, deren Überlebenszeit sich signifikant unterschied. Der Vergleich der Daten der Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen (WHO-Klasse II und III) mit den Daten der 29 hoch differenzierten, lokalisierten neuroendokrinen Tumoren (WHO-Klasse I) legt nahe, dass Survivin im Verlauf der Tumorprogression der GEP-NET hochreguliert wird: Alle 29 lokalisierten Tumoren waren negativ, 5 der 50 Tumore der WHO-Klasse II exprimierten nukleäres Survivin, aber alle 10 niedrig differenzierten neuroendokrinen Karzinome (WHO-Klasse III) zeigten eine Expression von nukleärem Survivin.

Der Vergleich der Expression von Survivin bei Primärtumor und Metastase

Bezüglich der Survivin-Expression sind bislang nur einzelne vergleichende Untersuchungen an Primärtumoren und dazugehörigen Metastasen durchgeführt worden. Tomoyuki und Kollegen führten 2002 eine vergleichende Untersuchung an Primärtumoren und dazugehörigen Metastasen von 37 kolorektalen Karzinomen durch. Dabei waren 31 der Primärtumore, aber nur 24 der dazugehörigen Metastasen für Survivin positiv. Daraus schlossen die Autoren abweichend von der vorliegenden Arbeit auf eine Herunterregulierung von Survivin im Verlauf der Erkrankung. Allerdings wurde bei dieser Arbeit nur das zytoplasmatische Vorkommen von Survivin untersucht. Außerdem handelt es sich hier um eine andere Tumorentität, so dass ein Vergleich mit unseren Daten daher nur bedingt möglich ist. Andere Arbeiten, die die nukleäre Expression von Survivin bei Primärtumor und Metastase vergleichend untersucht haben, wurden bislang nicht publiziert. In der vorliegenden Untersuchung konnte in allen vorhandenen 17 Fällen gezeigt werden, dass die Expression von Survivin in Primärtumor und Metastase jeweils gleich war; also entweder rein zytoplasmatisch oder

rein nukleär. Dieses Ergebnis einer kongruenten Expression von Survivin in Primärtumor und Metastase kann besonders in Fällen, in denen Material einer Metastase vorhanden, der Primärtumor aber unbekannt ist, klinische Bedeutung erlangen, da demzufolge von der Metastase auf den Survivin-Status des Primärtumors geschlossen werden und daraus Implikationen für Prognose und Therapie abgeleitet werden können. Ein aktuelles Beispiel hierfür ist der Nachweis von KRAS beim metastasierten kolorektalen Karzinom. Hierbei handelt es sich um einen Mediator der EGFR-regulierten Signaltransduktionskaskade, bei dem ebenfalls eine hohe Konkordanz zwischen Primärtumor und Metastase gefunden wurde (Santini, Loupakis et al. 2008). KRAS, dessen Wildtyp ein gutes, die Mutation jedoch ein schlechtes Ansprechen auf die Therapie mit EGFR-Antikörpern anzeigt, ist ein hervorstechendes Beispiel dafür, wie der Nachweis von Biomarkern das Therapieregime einer Tumorentität grundlegend verändern und die Prognose verbessern kann (Van Cutsem, Kohne et al. 2009).

Die prognostische Bedeutung von Survivin bei GEP-NET und anderen neuro- endokrinen Tumorentitäten in der Literatur

Die Beziehung zwischen der Expression von Survivin in neuroendokrinen Tumoren und der Überlebensprognose wurde bisher nur in wenigen Studien untersucht. Zhang und Kollegen zeigten in einer Untersuchung an Prostatakarzinomen, dass die Überexpression von Survivin mit einer besseren Prognose verbunden ist (Zhang, Ho et al. 2008). Allerdings lag ihrer Auswertung ein anderer Score zugrunde, so dass die Ergebnisse der Untersuchung mit der vorliegenden nicht vergleichbar ist. Davon abweichend war laut einer Studie der Arbeitsgruppe um Xiang die Expression von Survivin in neuroendokrinen Zellen beim Prostata-Karzinom mit einer schlechten Prognose verbunden (Xing, Qian et al. 2001). Koch und Kollegen (Koch, Vortmeyer et al. 2002) konnten am Phäochromozytom keine Beziehung zwischen der Expression von Survivin und Malignität belegen. Beide letztgenannten Studien unterschieden allerdings nicht zwischen zytoplasmatischem und nukleärem Vorkommen von Survivin.

Die prognostische Bedeutung der subzellulären Verteilung von Survivin

Die subzelluläre Verteilung scheint jedoch wichtig für den Stellenwert von Survivin als prognostischem Marker zu sein. In der vorliegenden Untersuchung war nur die Expression von Survivin im Zellkern (=nukleäres Survivin) mit einer schlechten Überlebensprognose verbunden. Eine Korrelation zwischen dem Vorkommen von

nukleärem Survivin und einer schlechteren Prognose konnte auch in neueren Untersuchungen an anderen Tumorentitäten, u.a. dem Glioblastom (Shirai, Suzuki et al. 2009), dem invasiven duktalem Mammakarzinom (Al-Joudi, Iskandar et al. 2007), Bronchialkarzinom (Lu, Gonzalez et al. 2004; Bria, Visca et al. 2008; Mohamed, Yasufuku et al. 2009), Mantelzellymphom (Martinez, Bellosillo et al. 2004) gezeigt werden. Die prognostische Bedeutung insbesondere der nukleären Lokalisation von Survivin ist jedoch nicht unumstritten. Altura und Kollegen fanden beispielsweise heraus, dass Survivin im normalen Ependym stark exprimiert ist und ein geringes Vorkommen nukleären Survivins beim kindlichen Ependymom mit einer schlechteren Prognose verbunden ist (Altura, Olshefski et al. 2003). Die Korrelation zwischen einer guten Prognose und der Expression von nukleärem Survivin wurde in Untersuchungen an Prostatakarzinomen (Zhang, Ho et al. 2008), Mammakarzinom, (Kennedy, O'Driscoll et al. 2003), Magenkarzinom (Okada, Murai et al. 2001) gezeigt. Peroukides und Kollegen wiesen in einer Untersuchung an hepatozellulären Karzinomen nukleäres Survivin nur bei gut differenzierten Tumoren nach (Peroukides, Bravou et al.).

Obwohl es auch einzelne Studien gibt, die eine negative Korrelation zwischen dem Vorkommen Survivins im Zytoplasma (=zytoplasmatisches Survivin) und der Überlebensrate zeigen (Ponnelle, Chapusot et al. 2005), kommt der Expression von zytoplasmatischem Survivin der vorliegenden Untersuchung zufolge keine Bedeutung als eigenständigem Prognosefaktor zu: 11 von 29 (~38%) lokalisierten Tumoren der WHO-Gruppe I aber nur ein Drittel der fortgeschrittenen Tumoren (Gruppe II und III) wiesen eine zytoplasmatische Expression von Survivin auf. Auch eine vorhergehende Studie aus der Arbeitsgruppe von Grabowski und Kollegen an 84 Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus belegt, dass das Überleben der Patienten nur mit dem nukleären Vorkommen von Survivin (80% der Fälle) korreliert; ein Nachweis zytoplasmatischen Survivins hatte keinerlei prognostische Bedeutung (Grabowski, Kuhnel et al. 2003). In der oben zitierten Studie von Shirai und Kollegen am Glioblastom bestand zwischen der Expression von zytoplasmatischem Survivin und der Überlebenszeit ebenfalls keine Korrelation (Shirai, Suzuki et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass fünf der metastasierten GEP-NET (WHO-Klassen II und III) Survivin sowohl im Zytoplasma als auch im Kern exprimierten. Diese fünf Patienten lebten länger als die übrigen 10 Patienten beider Gruppen, deren Tumore nur nukleäres Survivin exprimierten.

Die Entdeckung unterschiedlicher Spleißvarianten von Survivin durch Mahotka und Kollegen (Mahotka, Wenzel et al. 1999) bildete die Grundlage weiterer molekulargenetischer Untersuchungen, um die Unterschiede in der subzellulären Verteilung und die Feinabstimmung von Survivin in seiner dualen Rolle als Apoptoseinhibitor und Regulation der Mitose besser zu verstehen. Mittlerweile sind in der Literatur vier Spleißvarianten vom Survivin-Wildtyp (4 Exons) beschrieben: Survivin-2B (Insertion eines alternativen Exons 2), Survivin- Δ Ex3 (Deletion des Exons 3), Survivin-3B (Insertion eines alternativen Exons 3) und Survivin-2 α (Auftreten eines Stoppcodons im Intron 2). Mahotka und Kollegen zeigten, dass Survivin- Δ Ex3 ausgeprägt die antiapoptotische Wirkung hemmt, während Survivin-2B seine antiapoptotische Wirkung verloren hat (Mahotka, Liebmann et al. 2002). Survivin-2 α soll mit Survivin interagieren und dessen antiapoptotische Wirkung abschwächen (Caldas, Honsey et al. 2005). Caldas und Kollegen fanden in einer Untersuchung an Medulloblastomzellen heraus, dass der Survivin-Wildtyp mit zwei seiner Spleißprotein-Produkte, Survivin-2B oder Survivin- Δ Ex3, interagiert und Komplexe bildet, die dann innerhalb der Tumorzellen ihre Lokalisation wechseln können, Mitochondrien-assoziierte Strukturen bilden und die mitochondriale Apoptose hemmen (Caldas, Jiang et al. 2005; Fangusaro, Jiang et al. 2005). Die Bedeutung der Expression verschiedener Isoformen von Survivin für den Krankheitsverlauf wurde bisher an verschiedenen Tumorentitäten untersucht: Krieg und Kollegen berichteten, dass beim Magenkarzinom der Verlust von Survivin-2B mit der Tumorprogression verbunden war (Krieg, Mahotka et al. 2002). Die Arbeitsgruppe um Taubert fand bei ihrer PCR-Analyse von 76 Weichteilsarkomen heraus, dass die Expression von Survivin- Δ Ex3 mit einem 7,6 fach erhöhten Risiko eines tumorbedingten Todes verbunden war (Taubert, Kappler et al. 2005). Ling und Kollegen zeigten in einer PCR-basierten Untersuchung an Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen ebenfalls, dass das Vorkommen von Survivin- Δ Ex3-Gen signifikant mit Rezidiven und tumorbedingtem Tod verbunden war, während dies bei Survivin-2B nicht der Fall war (Ling, Yang et al. 2005). Eine kürzliche Veröffentlichung von der Arbeitsgruppe um Nakano über eine kombiniert PCR-basierte und immunhistochemische Untersuchung von 134 nicht-kleinzelligen Bronchialzellkarzinomen könnte einen ersten Erklärungsansatz für die auch in der vorliegenden Arbeit gezeigte Korrelation zwischen dem Vorkommen *nukleären* (Pan-) Survivins und der Prognose darstellen (Nakano, Huang et al. 2008): Sie wiesen eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Survivin- Δ Ex3 und der Expression

von nukleärem Gesamt-Survivin nach. Survivin- Δ Ex3 war mit der Tumorzellproliferation assoziiert und signifikant stärker bei fortgeschrittenen Tumoren der Stadien II und III exprimiert. Der Nachweis des Survivin-Wildtyps korrelierte mit einer erhöhten Tumorzellproliferation und Apoptose-Inhibition. Die Expression von Survivin-2B korrelierte weder mit der Tumorzellproliferation noch mit der Apoptose-Inhibition. Die Autoren vermuten, dass es sich beim Nachweis von nukleärem Gesamt-Survivin um den Nachweis des Wildtyps und von Survivin- Δ Ex3 (letzteres ist eher im Zellkern lokalisiert, (Mahotka, Liebmann et al. 2002) handelt, während der Nachweis zytoplasmatischen Gesamt-Survivins die Expression vom Wildtyp und Survivin-2B (das die antiapoptotische Funktion vom Wildtyp hemmt) anzeigen könnte. Die PCR-basierte Analyse sowie der immunhistochemische Nachweis der verschiedenen Survivin-Isoformen wird also ein wichtiger Gegenstand künftiger Untersuchungen von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren sein.

Die Klassifikation des Patientenkollektivs nach den WHO-Kriterien und nach dem neuen TNM-System

Die Anwendung der WHO-Kriterien auf das vorliegende Patientenkollektiv belegt den Wert der aktuellen Klassifikation bezüglich der WHO-Klassen I und III: In der Gruppe der als WHO-Klasse I klassifizierten Tumore ergab das 5-Jahres-follow-up kein Rezidiv oder tumorbedingten Tod. Alle Patienten, deren Tumore der WHO-Klasse III zugeordnet worden waren, zeigten ein sehr limitiertes Überleben von durchschnittlich 13 Monaten. Die Patienten mit Tumoren, die nach den WHO-Kriterien als Klasse-II zusammengefasst worden waren, zeigten im follow-up ein sehr heterogenes Ergebnis: Die Überlebenszeit lag zwischen 1 Monat und mehr als 10 Jahren. Diese Resultate zeigen, dass die Kriterien der aktuellen WHO-Klassifikation offensichtlich für eine genaue Prognose der Tumore der WHO-Klasse II unzureichend sind.

Die von der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) 2006 und 2007 etablierte TNM-Klassifikation für GEP-NET standen zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchung noch nicht zur Verfügung, so dass beispielsweise der für die Prognose und Einteilung wichtige Lymphknotenstatus nicht berücksichtigt werden konnte. Eine Studie von der Arbeitsgruppe um Pape an 202 Patienten mit einem neuroendokrinen Tumor des Vorderdarms untersuchte retrospektiv den prognostischen Wert der neuen TNM-Klassifikation.. Die Autoren konnten zeigen, dass das TNM-System der WHO-Klassifikation in der Differenzierung zwischen den einzelnen Tumorstadien und der

Proliferationsrate überlegen ist (Pape, Jann et al. 2008). Inzwischen ist die TNM-Klassifikation seit dem Erscheinen der 7. Auflage der TNM-Klassifikation in diesem Jahr auch für die GEP-NET bindend.

Ki-67/MIB-1 als prognostischer Marker

Der erstmalige Nachweis des Proteins Ki-67 1984 von Gerdes et al hat aufgrund der Eigenschaft von Ki-67, nur in proliferierenden Zellen (d.h. in allen Phasen des Zellzyklus mit Ausnahme der G₀-Phase) exprimiert zu werden, klinische Bedeutung als Maß für die Wachstumsfraktion von gesundem und Tumorgewebe erlangt (Brown and Gatter 1990; Hall and Woods 1990). Es existieren verschiedene gegen Ki-67 gerichtete Antikörper. In der vorliegenden Arbeit wurde der MIB-1-Antikörper verwendet, da er im Gegensatz zum ursprünglich verwendeten, namensgebenden und nur für kryokonserviertes Frischgewebe geeigneten Antikörper gegen Ki-67, auch an Paraffinschnitten und somit auch für retrospektive Untersuchungen wie die vorliegende verwendet werden kann (Cattoretti, Becker et al. 1992). Es existieren in der Literatur zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen Tumorentitäten, in denen die Bedeutung der Expression von Ki-67 als Faktor für die tumorabhängige Prognose und Mortalität gezeigt werden konnte, z.B. an Non-Hodgkin-Lymphomen (Szczeraszek, Mazur et al. 2008; Broyde, Boycov et al. 2009), Mammakarzinomen (Jansen, Hupperets et al. 1998), Prostatakarzinomen (Bubendorf, Sauter et al. 1996), Kopf-Hals-Tumore, neuroendokrinen Bronchialkarzinomen (Bohm, Koch et al. 1996), Neuroblastomen (Rudolph, Lappe et al. 1997). Es wurden diesbezüglich aber nur wenige Untersuchungen an GEP-NET durchgeführt, davon nur einzelne mit einem 5-Jahres-follow-up. Hinzu kommt, dass nicht allen Untersuchungen der gleiche cut-off-Wert zugrunde gelegt wurde, so dass die Vergleichbarkeit eingeschränkt ist. In drei Studien wurde die Ki-67-Expression an funktionellen und nonfunktionellen neuroendokrinen Pankreastumoren untersucht. Die Gruppe um Gentil Perret kam dabei zu dem Schluss, dass Ki-67 einen unabhängigen Prognosefaktor bei dieser Tumorentität darstellt; zum gleichen Ergebnis führte auch eine Untersuchung von Pelosi und Kollegen an angioinvasiven, bereits metastasierten NET des Pankreas (La Rosa, Sessa et al. 1996; Pelosi, Bresaola et al. 1996; Gentil Perret, Mosnier et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit korrelierte in den Tumoren der WHO-Klasse I und III die Ki-67-Expression mit der Überlebenszeit: in der WHO-Klasse I waren alle Tumore Ki-67 negativ und es gab keine Rezidive oder tumorbedingten Tod, in der WHO-Klasse III, in

der alle Tumore viel Ki-67 (>20%) exprimierten, überlebten die Patienten durchschnittlich nur einen Zeitraum von 13 Monate nach Diagnosestellung. In der WHO-Klasse II (44 Patienten mit hoch differenzierten neuroendokrinen Karzinomen) war die Expression von Ki-67 ohne prognostische Bedeutung, was allerdings den kleinen Fallzahlen geschuldet sein mag. 8 Patienten lebten länger, als es nach der Ki-67-Expression zu erwarten gewesen wäre.

Auch in der Literatur finden sich Untersuchungen, denen zufolge die prognostische Bedeutung von Ki-67 bei Erkrankungen an GEP-NET umstritten ist: Canavese und Kollegen fanden in einer Untersuchung an 109 GEP-NET, in der sie die Expression von verschiedenen KIP (kinase inhibitor proteins) mit der Expression von Ki-67 korrelierten, ebenfalls heraus, dass durch den Nachweis von Ki-67 zwar zwischen Tumoren der WHO-Klasse III (Ki-67 >40%) und gut differenzierten GEP-NET der Klassen I (Ki-67 0,05%) und II (Ki-67 1,99%) differenziert werden kann, Ki-67 aber als unabhängiger Prognosefaktor innerhalb der Tumore der WHO-Klasse II keine Bedeutung zukommt (Canavese, Azzoni et al. 2001; Van Eeden, Quaedvlieg et al. 2002). In einigen Studien war die Expression von Ki-67 zwar tatsächlich mit einer Tumorprogression verbunden, sie stellte aber keinen unabhängigen Prognosefaktor dar (Rindi, Azzoni et al. 1999).

Der Vergleich der Expression von Ki-67/MIB-1 und Survivin

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Expression von nukleärem Survivin und Ki-67 bei GEP-NET in Korrelation gesetzt. Der Vergleich der immunhistochemischen Färbungen von Survivin und Ki-67 führte zu dem Ergebnis, dass viel mehr neuroendokrine Tumorzellen Ki-67 als Survivin exprimierten. Am deutlichsten war dies bei 8 Patienten des Kollektivs, deren Tumore (WHO-Klasse II) einen hohen Ki-67-Proliferationsindex zeigten, aber kein nukleäres Survivin exprimierten. Da bislang als prognostischer Marker nur Ki-67 etabliert war, waren diese 8 Patienten allein aufgrund des hohen Ki-67-Proliferationsindex als Hochrisikopatienten für eine Tumorprogression eingestuft worden, obwohl dies rückblickend nicht der Fall war: Nur ein Patient starb am Tumor, 7 der 8 Patienten überlebten. Das ist ein unerwartetes Ergebnis, könnte aber in den geringen Fallzahlen begründet sein.

Ähnliche Beobachtungen wurden jedoch bereits an normalem ösophagealen Plattenepithel (Gianani, Jarboe et al. 2001; Grabowski, Kuhnel et al. 2003) und an normaler Mukosa des Kolons (Gianani, Jarboe et al. 2001) gemacht. Der beobachtete Unterschied in der Expression von Ki-67 und nukleärem Survivin und die Rolle von

Survivin bei der Tumorprogression lässt sich anhand der unterschiedlichen Funktionen im Zellzyklus erklären: Ki-67 wird in jeder Phase des Zellzyklus exprimiert (Endl and Gerdes 2000), wohingegen Survivin in der G2/M-Phase hoch- und in der G1-Phase herunterreguliert wird (Li, Ackermann et al. 1999). Wenn der Zellzyklus durch einen G1/S-Arrest verlängert ist, sind wesentlich mehr Mitosen sichtbar, die aber nicht notwendigerweise eine beschleunigte Wachstumsrate widerspiegeln.

Die Bedeutung des Nachweises von Survivin für die Therapie

Bei der Bewertung der prognostischen Bedeutung der Expression von Survivin muss der mögliche Einfluss von Therapien auf die Überlebenszeit mitberücksichtigt werden. Das in der Arbeit verwendete Tumormaterial stammt aus den Jahren 1981-2001. Die Tatsache, dass das gesamte Material entnommen wurde, bevor Therapien einwirken konnten, erhöht die Aussagekraft und Vergleichbarkeit der in der Untersuchung erhobenen Daten. Zudem waren zur damaligen Zeit nur wenige Therapien verfügbar, deren Einfluss auf die Überlebenszeit Studien zufolge eher als gering einzuschätzen ist: Einige Patienten erhielten eine systemische Chemotherapie, die beim NET des Magens, Dünndarms oder Dickdarms in verschiedenen Studien einen nur kurzanhaltenden therapeutischen Effekt in nur 10% der Fälle erbrachte (Arnold and Frank 1996; Rougier and Mitry 2000). Nur schnellwachsende kleinzellige GEP-NET (WHO-Klasse III) sprechen einer Untersuchung von Moertel und Kollegen zufolge auf eine Therapie mit Etoposid und Cisplatin mit einer Response-Rate (RR) von 67%, aber einer Remissionsdauer von weniger als 8 Monaten an (Moertel, Kvols et al. 1991; O'Toole, Hentic et al. 2004). Eine partielle Remission wurde bei 39% der pankreatischen NET unter Streptozotocin und Doxorubicin bzw. 5-Fluoruracil mit einer Dauer des Ansprechens von 9 Monaten (Moertel, Lefkopoulo et al. 1992) erzielt. Einige Patienten des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kollektivs erhielten im Verlauf eine Behandlung mit langwirksamen Somatostatinanaloga (sogenannte „Biotherapie“) mit einer medianen symptomatischen Response von 60% (Harris and Redfern 1995) und einer biochemischen Response von 70%. Erst seit kürzester Zeit ist durch die erste multizentrische placebo-kontrollierte Studie (ProMID) der Nachweis erbracht worden, dass Octreotid auch antiproliferativ wirkt: Es kommt zu einer Verdopplung des progressionsfreien Überlebens (Rinke, Muller et al. 2009). Die Frage, ob Octreotid-LAR das Gesamtüberleben verlängert, kann bisher nicht beantwortet werden. Einzelne Patienten des Kollektivs wurden auch einer Behandlung mit α -Interferon unterzogen,

womit Studien zufolge zwar biochemische und symptomatische Responderaten von 50%, jedoch eine Tumorreduktion in nur 15% der Fälle mit einer Dauer von 3-4 Jahren erreicht wurden (Oberg 1992). Eine Kombination von Somatostatin und Interferon, wie auch in fünf Fällen des Kollektivs erfolgt, bringt einer Untersuchung von Faiss und Kollegen zufolge keinen zusätzlichen Nutzen in Bezug auf die Tumorprogression (Faiss, Pape et al. 2003). Im Vergleich dazu sind die Behandlungen durch die hinzugekommenen neuen multimodalen Therapieschemata komplexer geworden: Lokal-ablative Verfahren dienen vor allem der Tumorkontrolle beim Vorliegen von Lebermetastasen: Die Anwendung der RFA führt Studien zufolge bei niedrigerer Tumorlast zu einer 71-95%igen Symptomrückbildung und Symptomkontrolle über 8-10 Monate, biologischen Ansprechen von 65% und einer Verlängerung des Gesamtüberlebens von 18 Monaten nach Behandlung (Vogl, Naguib et al. 2009). Bei hoher Tumorlast kann mittels TACE kann eine komplette oder partielle Symptomreduktion in 60-95% der Fälle über durchschnittlich 20-80 Monate erreicht werden, die durchschnittliche Zeit bis zur Tumorprogression liegt jedoch nur bei 14 Monaten (Marrache, Vullierme et al. 2007; Vogl, Naguib et al. 2009). Die Anwendung der SIRT führt einer Untersuchung von Kennedy und Kollegen in 22,7% der Fälle zu eine Stabilisierung, zu einem partiellen (60,5%) oder vollständigen Ansprechen (2,7%) jedoch bei einer progressionsfreien Zeit von nur 11 Monaten (Kennedy, Dezarn et al. 2008; Kalinowski, Dressler et al. 2009).

Große Studien belegen die klinische Wirksamkeit der PRRT (Forrer, Valkema et al. 2007). Bei der mittlerweile häufig angewendeten PRRT konnte in einer aktuellen Studie in 28% d.F. eine partielle Remission mit einer durchschnittlichen Dauer bis zur Krankheitsprogression von 40 Monaten erreicht werden (Kwekkeboom, de Herder et al. 2008). Andere Untersuchungen ergaben eine Tumorregression von 50% in 22% d. F. und eine Zeit bis zur nächsten Progression von 30 Monaten (Van Essen, Krenning et al. 2007).

Neuerdings finden molekulare Wirkstoffe wie z.B. Sunitinib Eingang in die Therapie neuroendokriner Tumoren mit einer signifikanten Verlängerung der progressionsfreien Zeit um 5½ Monate (Raymond, Faivre et al. 2009).

Zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchung waren die geschilderten komplexen multimodalen Therapien noch nicht verfügbar. 37 Patienten des Kollektivs erhielten, wie in Tabelle 7 dargestellt, nach Entnahme des Tumormaterials nur wenige zusätzliche Therapien (Chemotherapie, Biotherapie, Interferon, Radiatio), die laut Studienlage auch

nur einen geringen Einfluß auf die Prognose haben. Eine Untersuchung an einem so einheitlichen Patientenkollektiv, wie dem vorliegenden, an dem noch keine Therapien einwirken konnten, stellt daher eine Rarität dar.

Kürzlich wurden die ersten beiden Studien über den ersten spezifischen Survivin-Inhibitor, YM155, veröffentlicht. Nakahara und Kollegen konnten in einer präklinischen Untersuchung von YM155 an Zelllinien von Hormon-resistenten-Prostata-Karzinomen die Suppression von Survivin, Apoptose-Induktion und in vivo am Mausmodell eine massive Tumorreduktion ohne ausgeprägte systemische Toxizität zeigen (Nakahara, Takeuchi et al. 2007). Tolcher et al publizierten kürzlich eine Phase-I-Studie mit 41 Patienten, die an fortgeschrittenen Tumorerkrankungen verschiedener Entitäten litten (Tolcher, Mita et al. 2008). Durch die Applikation von YM155 wurden bei drei B-Zell-Lymphomen eine komplette und zwei partielle Remissionen über 8, 24 und 48 Monate ohne schwere systemische Nebenwirkungen erzielt. Bei zwei Patienten, die an einem Prostatakarzinom litten, kam es nach der Behandlung mit YM155 zu einem Rückgang der Konzentration des Tumormarkers Prostata spezifisches Antigen (PSA) i.S. einer biochemischen Response. Interessanterweise respondierten in der Studie auf die Behandlung mit dem Survivin-Inhibitor YM155 die Tumorentitäten, bei denen eine negative Korrelation zwischen Survivin-Expression und Prognose in der Literatur beschrieben ist (Adida, Haioun et al. 2000; Tracey, Perez-Rosado et al. 2005; Zhang, Ho et al. 2008). Im Rahmen der 2009 von Giaccone und Kollegen publizierten multizentrischen Phase-II-Untersuchung erhielten 37 Patienten mit fortgeschrittenen, therapierefraktären nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen YM155. Bei 43,2% der Patienten wurde unter der Therapie eine Stabilisierung beziehungsweise partielles Ansprechen erreicht, die progressionsfreie Zeit betrug 1,7 Monate, die durchschnittliche Überlebensdauer 6,6 Monate. Die Therapie wurde gut vertragen (Giaccone, Zatloukal et al. 2009).

Der vorliegenden Untersuchung zufolge wird es ein interessanter Gegenstand künftiger prospektiver Untersuchungen an GEP-NET sein, die Expression von nukleärem Survivin vor Beginn einer Behandlung zu bestimmen und mit dem Behandlungserfolg in Korrelation zu setzen.

Zusammenfassung

Für die vorliegende Untersuchung wurde ein gut definiertes Patientenkollektiv von GEP-NET's mit 5-Jahres-follow-up erstellt, das in Anbetracht des seltenen Vorkommens der untersuchten Tumorentitäten von beträchtlicher Größe ist.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Expression von nukleärem Survivin einen neuen Prognosefaktor bei gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren darstellt. Innerhalb der Gruppe der WHO-Klasse-II-Tumore können durch den immunhistochemischen Nachweis von nukleärem Survivin erstmalig Subgruppen mit guter (negativer Survivin-Nachweis) oder weniger günstiger (positiver Survivin-Nachweis) Prognose identifiziert werden. Darüber hinaus legen die vorliegenden Daten nahe, dass die subzelluläre Lokalisation von Survivin für die Feinabstimmung seiner Funktion entscheidend ist, da nur die Expression von nukleärem Survivin mit der Prognose korreliert und einen bedeutenden pathogenetischen Faktor für die Tumorprogression darstellt.

Desweiteren zeigt diese Arbeit, dass der alleinige Nachweis von Ki-67 bei den GEP-NET der WHO-Klasse II für eine prognostische Einschätzung unzureichend ist.

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird ersichtlich, dass der immunhistochemische Nachweis von (nukleärem) Survivin bei GEP-NET routinemäßig erfolgen sollte, zumal es sich um eine überall verfügbare und klinisch leicht praktikable Methode handelt. Der routinemäßige Nachweis von Survivin schon bei Diagnosestellung kann somit künftig zu einer Individualisierung der Therapie beitragen.

Alle Daten der vorliegenden Untersuchung wurden retrospektiv erhoben. Zur Validierung der Ergebnisse sollten sich prospektive Studien anschließen. Zur weiteren Aufklärung der Funktion von Survivin sind Untersuchungen an Zelllinien erforderlich.

Literaturverzeichnis

- Adida, C., C. Haioun, et al. (2000). "Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas." Blood **96**(5): 1921-5.
- Al-Joudi, F. S., Z. A. Iskandar, et al. (2007). "Survivin expression correlates with unfavourable prognoses in invasive ductal carcinoma of the breast." Med J Malaysia **62**(1): 6-8.
- Altieri, D. C. (2006). "The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions." Curr Opin Cell Biol **18**(6): 609-15.
- Altura, R. A., R. S. Olshefski, et al. (2003). "Nuclear expression of Survivin in paediatric ependymomas and choroid plexus tumours correlates with morphologic tumour grade." Br J Cancer **89**(9): 1743-9.
- Arnold, R. and M. Frank (1996). "Gastrointestinal endocrine tumours: medical management." Baillieres Clin Gastroenterol **10**(4): 737-59.
- Beltrami, E., J. Plescia, et al. (2004). "Acute ablation of survivin uncovers p53-dependent mitotic checkpoint functions and control of mitochondrial apoptosis." J Biol Chem **279**(3): 2077-84.
- Bohm, J., S. Koch, et al. (1996). "Prognostic value of MIB-1 in neuroendocrine tumours of the lung." J Pathol **178**(4): 402-9.
- Bosman, F. T. (1997). "Neuroendocrine cells in non-endocrine tumors: what does it mean?" Verh Dtsch Ges Pathol **81**: 62-72.
- Brenner, B., L. H. Tang, et al. (2004). "Small-cell carcinomas of the gastrointestinal tract: a review." J Clin Oncol **22**(13): 2730-9.
- Bria, E., P. Visca, et al. (2008). "Nuclear and cytoplasmic cellular distribution of survivin as survival predictor in resected non-small-cell lung cancer." Eur J Surg Oncol **34**(5): 593-8.
- Brown, D. C. and K. C. Gatter (1990). "Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology." Histopathology **17**(6): 489-503.
- Broyde, A., O. Boycov, et al. (2009). "Role and prognostic significance of the Ki-67 index in non-Hodgkin's lymphoma." Am J Hematol **84**(6): 338-43.
- Bubendorf, L., G. Sauter, et al. (1996). "Ki67 labelling index: an independent predictor of progression in prostate cancer treated by radical prostatectomy." J Pathol **178**(4): 437-41.

- Buchanan, K. D., C. F. Johnston, et al. (1986). "Neuroendocrine tumors. A European view." Am J Med **81**(6B): 14-22.
- Buffa, R., G. Rindi, et al. (1987). "Synaptophysin immunoreactivity and small clear vesicles in neuroendocrine cells and related tumours." Mol Cell Probes **1**(4): 367-81.
- Caldas, H., L. E. Honsey, et al. (2005). "Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies." Mol Cancer **4**(1): 11.
- Caldas, H., Y. Jiang, et al. (2005). "Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death." Oncogene **24**(12): 1994-2007.
- Canavese, G., C. Azzoni, et al. (2001). "p27: a potential main inhibitor of cell proliferation in digestive endocrine tumors but not a marker of benign behavior." Hum Pathol **32**(10): 1094-101.
- Capella, C., P. U. Heitz, et al. (1995). "Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut." Virchows Arch **425**(6): 547-60.
- Cattoretti, G., M. H. Becker, et al. (1992). "Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections." J Pathol **168**(4): 357-63.
- Chen, K. T. (1989). "Composite adenoma-small-cell undifferentiated carcinoma of the colon." Am J Surg Pathol **13**(5): 429-30.
- Chott, A., G. Kloppel, et al. (1987). "Neuron specific enolase demonstration in the diagnosis of a solid-cystic (papillary cystic) tumour of the pancreas." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **410**(5): 397-402.
- Conway, E. M., S. Pollefeyt, et al. (2002). "Deficiency of survivin in transgenic mice exacerbates Fas-induced apoptosis via mitochondrial pathways." Gastroenterology **123**(2): 619-31.
- Cordell, J. L., B. Falini, et al. (1984). "Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes)." J Histochem Cytochem **32**(2): 219-29.
- Cox, W. F., Jr. and G. B. Pierce (1982). "The endodermal origin of the endocrine cells of an adenocarcinoma of the colon of the rat." Cancer **50**(8): 1530-8.
- Dacic, S., S. D. Finkelstein, et al. (2002). "Small-cell neuroendocrine carcinoma displays unique profiles of tumor-suppressor gene loss in relationship to the primary site of formation." Hum Pathol **33**(9): 927-32.

- De Maria, S., G. Pannone, et al. (2009). "Survivin gene-expression and splicing isoforms in oral squamous cell carcinoma." J Cancer Res Clin Oncol **135**(1): 107-16.
- Dohi, T., E. Beltrami, et al. (2004). "Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis." J Clin Invest **114**(8): 1117-27.
- Duh, Q. Y., C. P. Hybarger, et al. (1987). "Carcinoids associated with multiple endocrine neoplasia syndromes." Am J Surg **154**(1): 142-8.
- Endl, E. and J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function." Exp Cell Res **257**(2): 231-7.
- Faiss, S., U. F. Pape, et al. (2003). "Prospective, randomized, multicenter trial on the antiproliferative effect of lanreotide, interferon alfa, and their combination for therapy of metastatic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors--the International Lanreotide and Interferon Alfa Study Group." J Clin Oncol **21**(14): 2689-96.
- Fangusaro, J. R., Y. Jiang, et al. (2005). "Survivin, Survivin-2B, and Survivin-deltaEx3 expression in medulloblastoma: biologic markers of tumour morphology and clinical outcome." Br J Cancer **92**(2): 359-65.
- Fenoglio-Preiser, C. M. (2001). "Gastrointestinal neuroendocrine/neuroectodermal tumors." Am J Clin Pathol **115 Suppl**: S79-93.
- Forrer, F., R. Valkema, et al. (2007). "Neuroendocrine tumors. Peptide receptor radionuclide therapy." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **21**(1): 111-29.
- Gentil Perret, A., J. F. Mosnier, et al. (1998). "The relationship between MIB-1 proliferation index and outcome in pancreatic neuroendocrine tumors." Am J Clin Pathol **109**(3): 286-93.
- Gerdes, J., M. H. Becker, et al. (1992). "Immunohistological detection of tumour growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues." J Pathol **168**(1): 85-6.
- Gerdes, J., H. Lemke, et al. (1984). "Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67." J Immunol **133**(4): 1710-5.
- Giaccone, G., P. Zatloukal, et al. (2009). "Multicenter phase II trial of YM155, a small-molecule suppressor of survivin, in patients with advanced, refractory, non-small-cell lung cancer." J Clin Oncol **27**(27): 4481-6.

- Gianani, R., E. Jarboe, et al. (2001). "Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa." Hum Pathol **32**(1): 119-25.
- Grabowski, P., T. Kuhnel, et al. (2003). "Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma." Br J Cancer **88**(1): 115-9.
- Grabowski, P., J. Schrader, et al. (2008). "Loss of nuclear p27 expression and its prognostic role in relation to cyclin E and p53 mutation in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors." Clin Cancer Res **14**(22): 7378-84.
- Griffiths, D. F., G. T. Williams, et al. (1987). "Duodenal carcinoid tumours, phaeochromocytoma and neurofibromatosis: islet cell tumour, phaeochromocytoma and the von Hippel-Lindau complex: two distinctive neuroendocrine syndromes." Q J Med **64**(245): 769-82.
- Grossman, D., P. J. Kim, et al. (2001). "Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53." J Clin Invest **108**(7): 991-9.
- Hall, P. A. and A. L. Woods (1990). "Immunohistochemical markers of cellular proliferation: achievements, problems and prospects." Cell Tissue Kinet **23**(6): 505-22.
- Harris, A. G. and J. S. Redfern (1995). "Octreotide treatment of carcinoid syndrome: analysis of published dose-titration data." Aliment Pharmacol Ther **9**(4): 387-94.
- Helpap, B. and J. Kollermann (1999). "Undifferentiated carcinoma of the prostate with small cell features: immunohistochemical subtyping and reflections on histogenesis." Virchows Arch **434**(5): 385-91.
- Helpap, B. and J. Kollermann (2001). "Immunohistochemical analysis of the proliferative activity of neuroendocrine tumors from various organs. Are there indications for a neuroendocrine tumor-carcinoma sequence?" Virchows Arch **438**(1): 86-91.
- Hill, J. S., J. T. McPhee, et al. (2009). "Pancreatic neuroendocrine tumors: the impact of surgical resection on survival." Cancer **115**(4): 741-51.
- Honda, R., R. Korner, et al. (2003). "Exploring the functional interactions between Aurora B, INCENP, and survivin in mitosis." Mol Biol Cell **14**(8): 3325-41.
- Hsu, S. M. (1990). "Immunohistochemistry." Methods Enzymol **184**: 357-63.
- Hsu, S. M., L. Raine, et al. (1981). "Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures." J Histochem Cytochem **29**(4): 577-80.

- Huang, J., C. Behrens, et al. (2002). "Clonality of combined tumors." Arch Pathol Lab Med **126**(4): 437-41.
- Jansen, R. L., P. S. Hupperets, et al. (1998). "MIB-1 labelling index is an independent prognostic marker in primary breast cancer." Br J Cancer **78**(4): 460-5.
- Kalinowski, M., M. Dressler, et al. (2009). "Selective internal radiotherapy with Yttrium-90 microspheres for hepatic metastatic neuroendocrine tumors: a prospective single center study." Digestion **79**(3): 137-42.
- Kawasaki, H., D. C. Altieri, et al. (1998). "Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer." Cancer Res **58**(22): 5071-4.
- Kennedy, A. S., W. A. Dezarn, et al. (2008). "Radioembolization for unresectable neuroendocrine hepatic metastases using resin 90Y-microspheres: early results in 148 patients." Am J Clin Oncol **31**(3): 271-9.
- Kennedy, S. M., L. O'Driscoll, et al. (2003). "Prognostic importance of survivin in breast cancer." Br J Cancer **88**(7): 1077-83.
- Koch, C. A., A. O. Vortmeyer, et al. (2002). "Survivin: a novel neuroendocrine marker for pheochromocytoma." Eur J Endocrinol **146**(3): 381-8.
- Krieg, A., C. Mahotka, et al. (2002). "Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression." Br J Cancer **86**(5): 737-43.
- Kwekkeboom, D. J., W. W. de Herder, et al. (2008). "Treatment with the radiolabeled somatostatin analog [177 Lu-DOTA 0,Tyr3]octreotate: toxicity, efficacy, and survival." J Clin Oncol **26**(13): 2124-30.
- Kwekkeboom, D. J., J. J. Teunissen, et al. (2005). "Radiolabeled somatostatin analog [177Lu-DOTA0,Tyr3]octreotate in patients with endocrine gastroenteropancreatic tumors." J Clin Oncol **23**(12): 2754-62.
- La Rosa, S., F. Sessa, et al. (1996). "Prognostic criteria in nonfunctioning pancreatic endocrine tumours." Virchows Arch **429**(6): 323-33.
- Le Douarin, N. M. and M. A. Teillet (1973). "The migration of neural crest cells to the wall of the digestive tract in avian embryo." J Embryol Exp Morphol **30**(1): 31-48.
- Lee, C. S. (1996). "Lack of p53 immunoreactivity in pancreatic endocrine tumors." Pathology **28**(2): 139-41.
- Lei, Y., Z. Geng, et al. "Prognostic significance of survivin expression in renal cell cancer and its correlation with radioresistance." Mol Cell Biochem.

- Li, F., E. J. Ackermann, et al. (1999). "Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function." Nat Cell Biol **1**(8): 461-6.
- Ling, X., J. Yang, et al. (2005). "Differential expression of survivin-2B and survivin-DeltaEx3 is inversely associated with disease relapse and patient survival in non-small-cell lung cancer (NSCLC)." Lung Cancer **49**(3): 353-61.
- Livraghi, T., S. N. Goldberg, et al. (2000). "Hepatocellular carcinoma: radio-frequency ablation of medium and large lesions." Radiology **214**(3): 761-8.
- Lloyd, R. V., T. Mervak, et al. (1984). "Immunohistochemical detection of chromogranin and neuron-specific enolase in pancreatic endocrine neoplasms." Am J Surg Pathol **8**(8): 607-14.
- Lollgen, R. M., O. Hessman, et al. (2001). "Chromosome 18 deletions are common events in classical midgut carcinoid tumors." Int J Cancer **92**(6): 812-5.
- Lu, B., A. Gonzalez, et al. (2004). "Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer." Br J Cancer **91**(3): 537-40.
- Mahotka, C., J. Liebmann, et al. (2002). "Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants." Cell Death Differ **9**(12): 1334-42.
- Mahotka, C., M. Wenzel, et al. (1999). "Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties." Cancer Res **59**(24): 6097-102.
- Marrache, F., M. P. Vullierme, et al. (2007). "Arterial phase enhancement and body mass index are predictors of response to chemoembolisation for liver metastases of endocrine tumours." Br J Cancer **96**(1): 49-55.
- Martinez, A., B. Bellosillo, et al. (2004). "Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival." Am J Pathol **164**(2): 501-10.
- Mills, S. E., M. S. Allen, Jr., et al. (1983). "Small-cell undifferentiated carcinoma of the colon. A clinicopathological study of five cases and their association with colonic adenomas." Am J Surg Pathol **7**(7): 643-51.
- Mirza, A., M. McGuirk, et al. (2002). "Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway." Oncogene **21**(17): 2613-22.
- Modlin, I. M., K. Oberg, et al. (2008). "Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours." Lancet Oncol **9**(1): 61-72.

- Moertel, C. G., L. K. Kvols, et al. (1991). "Treatment of neuroendocrine carcinomas with combined etoposide and cisplatin. Evidence of major therapeutic activity in the anaplastic variants of these neoplasms." Cancer **68**(2): 227-32.
- Moertel, C. G., M. Lefkopoulo, et al. (1992). "Streptozocin-doxorubicin, streptozocin-fluorouracil or chlorozotocin in the treatment of advanced islet-cell carcinoma." N Engl J Med **326**(8): 519-23.
- Moertel, C. G., L. H. Weiland, et al. (1987). "Carcinoid tumor of the appendix: treatment and prognosis." N Engl J Med **317**(27): 1699-701.
- Mohamed, S., K. Yasufuku, et al. (2009). "Nuclear survivin in pN2 nonsmall cell lung cancer: prognostic and clinical implications." Eur Respir J **33**(1): 127-33.
- Mori, M., K. Mimori, et al. (1995). "Chromogranin positive cells in colorectal carcinoma and transitional mucosa." J Clin Pathol **48**(8): 754-8.
- Moyana, T. N., J. Xiang, et al. (2000). "The spectrum of neuroendocrine differentiation among gastrointestinal carcinoids: importance of histologic grading, MIB-1, p53, and bcl-2 immunoreactivity." Arch Pathol Lab Med **124**(4): 570-6.
- Nakahara, T., M. Takeuchi, et al. (2007). "YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts." Cancer Res **67**(17): 8014-21.
- Nakano, J., C. Huang, et al. (2008). "The clinical significance of splice variants and subcellular localisation of survivin in non-small cell lung cancers." Br J Cancer **98**(6): 1109-17.
- Nobels, F. R., D. J. Kwekkeboom, et al. (1998). "Chromogranin A: its clinical value as marker of neuroendocrine tumours." Eur J Clin Invest **28**(6): 431-40.
- Oberg, K. (1992). "Interferons in the management of neuroendocrine tumors and their possible mechanism of action." Yale J Biol Med **65**(5): 519-29; discussion 531-6.
- Oberg, K. (2001). "Chemotherapy and biotherapy in the treatment of neuroendocrine tumours." Ann Oncol **12 Suppl 2**: S111-4.
- Oberg, K., L. Kvols, et al. (2004). "Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system." Ann Oncol **15**(6): 966-73.
- O'Dowd, G. and J. R. Gosney (1995). "Absence of overexpression of p53 protein by intestinal carcinoid tumours." J Pathol **175**(4): 403-4.
- Okada, E., Y. Murai, et al. (2001). "Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients." Cancer Lett **163**(1): 109-16.

- Onaitis, M. W., P. M. Kirshbom, et al. (2000). "Gastrointestinal carcinoids: characterization by site of origin and hormone production." Ann Surg **232**(4): 549-56.
- O'Toole, D., O. Hentic, et al. (2004). "Chemotherapy for gastro-enteropancreatic endocrine tumours." Neuroendocrinology **80 Suppl 1**: 79-84.
- Panzuto, F., S. Nasoni, et al. (2005). "Prognostic factors and survival in endocrine tumor patients: comparison between gastrointestinal and pancreatic localization." Endocr Relat Cancer **12**(4): 1083-92.
- Pape, U. F., H. Jann, et al. (2008). "Prognostic relevance of a novel TNM classification system for upper gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors." Cancer **113**(2): 256-65.
- Pearse, A. G. and J. M. Polak (1971). "Neural crest origin of the endocrine polypeptide (APUD) cells of the gastrointestinal tract and pancreas." Gut **12**(10): 783-8.
- Pelosi, G., E. Bresaola, et al. (1996). "Endocrine tumors of the pancreas: Ki-67 immunoreactivity on paraffin sections is an independent predictor for malignancy: a comparative study with proliferating-cell nuclear antigen and progesterone receptor protein immunostaining, mitotic index, and other clinicopathologic variables." Hum Pathol **27**(11): 1124-34.
- Peroukides, S., V. Bravou, et al. "Survivin overexpression in HCC and liver cirrhosis differentially correlates with p-STAT3 and E-cadherin." Histol Histopathol **25**(3): 299-307.
- Ponnelle, T., C. Chapusot, et al. (2005). "Cellular localisation of survivin: impact on the prognosis in colorectal cancer." J Cancer Res Clin Oncol **131**(8): 504-10.
- Qi, G., Y. Kudo, et al. "Nuclear Survivin expression is correlated with malignant behaviors of head and neck cancer together with Aurora-B." Oral Oncol **46**(4): 263-70.
- Raymond, E., S. Faivre, et al. (2009). "Sunitinib paves the way for targeted therapies in neuroendocrine tumors." Target Oncol **4**(4): 253-4.
- Rindi, G., C. Azzoni, et al. (1999). "ECL cell tumor and poorly differentiated endocrine carcinoma of the stomach: prognostic evaluation by pathological analysis." Gastroenterology **116**(3): 532-42.

- Rindi, G., R. Buffa, et al. (1986). "Chromogranin A, B and C immunoreactivities of mammalian endocrine cells. Distribution, distinction from costored hormones/prohormones and relationship with the argyrophil component of secretory granules." Histochemistry **85**(1): 19-28.
- Rindi, G., M. E. Candusso, et al. (1999). "Molecular aspects of the endocrine tumours of the pancreas and the gastrointestinal tract." Ital J Gastroenterol Hepatol **31 Suppl 2**: S135-8.
- Rindi, G., G. Kloppel, et al. (2006). "TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system." Virchows Arch **449**(4): 395-401.
- Rindi, G., G. Kloppel, et al. (2007). "TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system." Virchows Arch **451**(4): 757-62.
- Rindi, G., A. B. Leiter, et al. (2004). "The "normal" endocrine cell of the gut: changing concepts and new evidences." Ann N Y Acad Sci **1014**: 1-12.
- Rindi, G., V. Villanacci, et al. (2000). "Biological and molecular aspects of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors." Digestion **62 Suppl 1**: 19-26.
- Rinke, A., H. H. Muller, et al. (2009). "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 **27**(28): 4656-63.
- Rosa, J., P. Canovas, et al. (2006). "Survivin modulates microtubule dynamics and nucleation throughout the cell cycle." Mol Biol Cell **17**(3): 1483-93.
- Rougier, P. and E. Mitry (2000). "Chemotherapy in the treatment of neuroendocrine malignant tumors." Digestion **62 Suppl 1**: 73-8.
- Rudolph, P., T. Lappe, et al. (1997). "Prognostic significance of the proliferative activity in neuroblastoma." Am J Pathol **150**(1): 133-45.
- Saclarides, T. J., D. Szeluga, et al. (1994). "Neuroendocrine cancers of the colon and rectum. Results of a ten-year experience." Dis Colon Rectum **37**(7): 635-42.
- Sampietro, G., G. Tomasic, et al. (2000). "Gene product immunophenotyping of neuroendocrine lung tumors. No linking evidence between carcinoids and small-cell lung carcinomas suggested by multivariate statistical analysis." Appl Immunohistochem Mol Morphol **8**(1): 49-56.

- Santini, D., F. Loupakis, et al. (2008). "High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice." Oncologist **13**(12): 1270-5.
- Shirai, K., Y. Suzuki, et al. (2009). "Nuclear survivin expression predicts poorer prognosis in glioblastoma." J Neurooncol **91**(3): 353-8.
- Steinmuller, T., R. Kianmanesh, et al. (2008). "Consensus guidelines for the management of patients with liver metastases from digestive (neuro)endocrine tumors: foregut, midgut, hindgut, and unknown primary." Neuroendocrinology **87**(1): 47-62.
- Stridsberg, M., K. Oberg, et al. (1995). "Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours." J Endocrinol **144**(1): 49-59.
- Sun, W., S. Lipsitz, et al. (2005). "Phase II/III study of doxorubicin with fluorouracil compared with streptozocin with fluorouracil or dacarbazine in the treatment of advanced carcinoid tumors: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1281." J Clin Oncol **23**(22): 4897-904.
- Suzuki, A., T. Ito, et al. (2000). "Survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death." Oncogene **19**(10): 1346-53.
- Szczuraszek, K., G. Mazur, et al. (2008). "Prognostic significance of Ki-67 antigen expression in non-Hodgkin's lymphomas." Anticancer Res **28**(2A): 1113-8.
- Tanaka, K., S. Iwamoto, et al. (2000). "Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas." Clin Cancer Res **6**(1): 127-34.
- Taubert, H., M. Kappler, et al. (2005). "Elevated expression of survivin-splice variants predicts a poor outcome for soft-tissue sarcomas patients." Oncogene **24**(33): 5258-61.
- Tolcher, A. W., A. Mita, et al. (2008). "Phase I and Pharmacokinetic Study of YM155, a Small-Molecule Inhibitor of Survivin." J Clin Oncol.
- Tracey, L., A. Perez-Rosado, et al. (2005). "Expression of the NF-kappaB targets BCL2 and BIRC5/Survivin characterizes small B-cell and aggressive B-cell lymphomas, respectively." J Pathol **206**(2): 123-34.

- Ubiali, A., A. Benetti, et al. (2001). "Genetic alterations in poorly differentiated endocrine colon carcinomas developing in tubulo-villous adenomas: a report of two cases." Virchows Arch **439**(6): 776-81.
- Vagnarelli, P. and W. C. Earnshaw (2004). "Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events." Chromosoma **113**(5): 211-22.
- Van Cutsem, E., C. H. Kohne, et al. (2009). "Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **360**(14): 1408-17.
- Van Eeden, S., P. F. Quaedvlieg, et al. (2002). "Classification of low-grade neuroendocrine tumors of midgut and unknown origin." Hum Pathol **33**(11): 1126-32.
- Van Essen, M., E. P. Krenning, et al. (2007). "Peptide Receptor Radionuclide Therapy with radiolabelled somatostatin analogues in patients with somatostatin receptor positive tumours." Acta Oncol **46**(6): 723-34.
- Vogl, T. J., N. N. Naguib, et al. (2009). "Liver metastases of neuroendocrine carcinomas: interventional treatment via transarterial embolization, chemoembolization and thermal ablation." Eur J Radiol **72**(3): 517-28.
- Vortmeyer, A. O., I. A. Lubensky, et al. (1997). "Concordance of genetic alterations in poorly differentiated colorectal neuroendocrine carcinomas and associated adenocarcinomas." J Natl Cancer Inst **89**(19): 1448-53.
- Wang, D. G., C. F. Johnston, et al. (1995). "Overexpression of the tumour suppressor gene p53 is not implicated in neuroendocrine tumour carcinogenesis." J Pathol **175**(4): 397-401.
- Weiler, R., R. Fischer-Colbrie, et al. (1988). "Immunological studies on the occurrence and properties of chromogranin A and B and secretogranin II in endocrine tumors." Am J Surg Pathol **12**(11): 877-84.
- Wiedenmann, B., W. W. Franke, et al. (1986). "Synaptophysin: a marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(10): 3500-4.
- Wiedenmann, B. and W. B. Huttner (1989). "Synaptophysin and chromogranins/secretogranins--widespread constituents of distinct types of neuroendocrine vesicles and new tools in tumor diagnosis." Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol **58**(2): 95-121.
- Wiedenmann, B., M. John, et al. (1998). "Molecular and cell biological aspects of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system." J Mol Med **76**(9): 637-47.

- Wilander, E. and L. Grimelius (1993). "Identification, characterization and classification of endocrine tumours." Zentralbl Pathol **139**(2): 95-100.
- Williams, E. D. and M. Sandler (1963). "The classification of carcinoid tumours." Lancet **1**: 238-9.
- Xing, N., J. Qian, et al. (2001). "Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin." Prostate **48**(1): 7-15.
- Zhang, M., A. Ho, et al. (2008). "Prognostic Value of Survivin in Locally Advanced Prostate Cancer: Study Based on RTOG 8610." Int J Radiat Oncol Biol Phys.
- Zhao, J., R. R. de Krijger, et al. (2000). "Genomic alterations in well-differentiated gastrointestinal and bronchial neuroendocrine tumors (carcinoids): marked differences indicating diversity in molecular pathogenesis." Am J Pathol **157**(5): 1431-8.

Erklärung

„Ich, Sonja Greshake, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die prognostische Bedeutung von Survivin bei gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Originalarbeiten

„Nuclear survivin is a powerful novel prognostic marker in neuroendocrine gastroenteropancreatic tumour disease”

P. Grabowski, **S. Griß**, C. N. Arnold, D. Hörsch, R. Göke, R. Arnold, B. Heine, H. Stein, M. Zeitz, H. Scherübl

Neuroendocrinology 2005;81:1-9

Kongressbeiträge, Abstracts, Poster

„Nuclear survivin is a novel prognostic marker in neuroendocrine gastroenteropancreatic tumor disease”

P. Grabowski, **S. Griß**, C.N. Arnold, D. Hörsch, R. Göke, R. Arnold, B. Heine, H. Stein, M. Zeitz, H. Scherübl

Poster at DDW New Orleans, 2004

Poster DGVS, 2004

„Nukleäres Survivin ist ein neuer prognostischer Marker für neuroendokrine gastroenteropankreatische Tumorerkrankungen“

P. Grabowski, **S. Griß**, C.N. Arnold, D. Hörsch, R. Göke, R. Arnold, B. Heine, H. Stein, M. Zeitz, H. Scherübl

Poster 10. Winterkurs der AGO Tübingen, 2004

“Aurora kinases as novel drug targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease: Antiproliferative and pro-apoptotic effects of ZM 447439, a new aurora kinase inhibitor, in BON and QGP-1 cells”

Poster ASCO 2008 eingereicht, wurde zitiert

Grabowski P, Georgieva I, Wang Y, Koychev D, **Griß S**, Arnold C, Hörsch D, Grünbaum M, Stein H and Zeitz M

“Aurora kinases as novel drug targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease: ZM 447439, 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”

Georgieva I, Wang Y, Koychev D, **Griß S**, Arnold C, Hörsch D, Stein H, Zeitz M and Grabowski P

Posterauszeichnung 5. Konferenz der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) 2008, Paris

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. Patricia Grabowski für die Überlassung des Themas und die überaus engagierte Betreuung dieser Arbeit.

Bei den Herren Prof. Dr. med. Harald Stein und Dr. med. Bernhard Heine vom Pathologischen Institut der Charité Campus Benjamin Franklin (CBF) möchte ich mich für die Unterstützung bei der Zusammenstellung des Tumormaterials bedanken.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. med. Rudolf Arnold und Prof. Dr. med. Christian Arnold für die freundliche Überlassung von Tumormaterial.

Ich danke den Mitarbeiterinnen des immunhistochemischen Labors des Instituts für Pathologie, CBF, für die freundliche Hilfestellung bei der technischen Durchführung der Experimente.