

Aus der medizinischen Klinik für Hepatologie und Gastroenterologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## **DISSERTATION**

### ***Expression und biologische Relevanz von Angiopoietin-2 in neuroendokrinen Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems***

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

von  
***Antje Deters***  
aus Crivitz

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. B. Wiedenmann  
2. Prof. Dr. med. C. A. Schmitt  
3. Prof. Dr. med. H. Scherübl

Datum der Promotion: 24.02.2012

Meinen Eltern und Christian

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1. Neuroendokrine Tumoren .....	7
1.1.1. Allgemeines.....	7
1.1.2. Klinik .....	7
1.1.2.1. Epidemiologie.....	8
1.1.3. Klassifikation .....	8
1.1.3.1. Histologische Typisierung .....	9
1.1.3.2. Tumormarker.....	9
1.1.4. Allgemeine prognostische Faktoren.....	9
1.1.4.1. Prognose.....	10
1.1.5. Diagnostik .....	11
1.1.6. Therapie.....	11
1.2. Angiopoietine.....	12
1.2.1. Allgemeine Grundlagen.....	12
1.2.2. Angiopoietin-2 und sein molekularer Wirkmechanismus.....	12
1.2.3. Angiopoietin-2 und Tumor assoziierte Angiogenese.....	13
1.2.4. Angiopoietin-2 in unterschiedlichen Tumorentitäten einschließlich der Bedeutung als prognostischer Faktor .....	14
1.3. Ziel .....	15
<b>2. Material</b> .....	<b>16</b>
2.1. Blutproben .....	16
2.2. Chemikalien.....	16
2.3. Patientencharakteristika .....	16
<b>3. Methoden</b> .....	<b>18</b>
3.1. Human Angiopoietin-2-Immunoassay .....	18
3.1.1. Allgemeines.....	18
3.1.2. Vorbereitung/Aufbereitung der Reagentien, Proben und Standards .....	18
3.1.3. Durchführung des Ang-2-ELISA.....	19

3.2. Statistische Analyse.....	20
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>21</b>
4.1. Angiopoietin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten.....	21
4.2. Angiopoietin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit von der Primärlokalisation .....	23
4.3. Angiopoietin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit von der Funktionalität .....	24
4.4. Angiopoietin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten unterschiedlicher Tumorgröße .....	25
4.5. Angiopoietin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit vom N-Status .....	26
4.6. Angiopoietin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten mit Metastasierung, im Speziellen mit Leberfiliae.....	27
4.7. Angiopoietin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten mit Angioinvasion.....	29
4.8. Angiopoietin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten mit Lymphangioinvasion.....	30
4.9. Angiopoietin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit vom Tumorgrading .....	31
4.10. Korrelation der Angiopoietin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten mit den Chromogranin-A-Serumspiegeln.....	32
4.11. Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Angio- poietin-2-Serumspiegels.....	33
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>34</b>
5.1. Erhöhung der Angiopoietin-2-Serumspiegel in GEP-NETs .....	35
5.2. Angiopoietin-2-Serumspiegel in Korrelation zum TNM-Stadium ....	36
5.2.1. Angiopoietin-2-Serumspiegel und T-Stadium.....	36

5.2.2. Angiopoietin-2-Serumspiegel und Lymphknotenmetastasierung/ <i>angioinvasion</i> .....	37
5.2.3. Angiopoietin-2-Serumspiegel und M-Stadium.....	38
5.3. Angiopoietin-2-Serumspiegel und andere Signalmoleküle.....	39
5.4. Angiopoietin-2-Serumspiegel und Angioinvasion.....	40
5.5. Angiopoietin-2-Serumspiegel und Grading.....	41
5.6. Angiopoietin-2-Serumspiegel und CgA-Spiegel.....	42
5.7. Angiopoietin-2-Serumspiegel und Überlebenszeitanalyse.....	43
5.8. Angiopoietin-2-Serumspiegel - ein Ausblick.....	44
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>46</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>47</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>61</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>61</b>
<b>10. Abkürzungsverzeichnis/Glossar.....</b>	<b>62</b>
<b>11. Curriculum vitae.....</b>	<b>64</b>
<b>12. Danksagung.....</b>	<b>65</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1. Neuroendokrine Tumoren**

### **1.1.1. Allgemeines**

Neuroendokrine Tumoren (NET) des gastroenteropankreatischen (GEP) Systems stellen eine Gruppe von Neoplasien dar, die aus den disseminiert angeordneten neuroendokrinen Zellen des Gastrointestinaltrakts hervorgehen. Gemeinsam ist diesen neuroendokrinen Zellen die Fähigkeit, spezielle Markerproteine, biogene Amine, Hormone sowie Neuropeptide zu exprimieren und sezernieren (Modlin et al. 1997, Jensen 2000). Daher besteht Ähnlichkeit sowohl zu Nervenzellen (Neuronen) als auch zu hormonproduzierenden (endokrinen) Zellen. GEP-NETs stellen molekular eine heterogene Tumorentität dar. Anhand ihrer Primärlokalisation, der Funktionalität (Hormonaktivität, funktionell/nicht funktionell), des Erbganges (sporadisch versus hereditär) sowie der Histologie/Differenzierung und dem damit verbundenen Proliferationsvermögen erfolgt eine Systematisierung (Rindi et al. 2006 und 2007).

### **1.1.2. Klinik**

Auf Grund der Heterogenität der Tumorgruppe zeigt sich die Klinik neuroendokriner Tumoren sehr vielfältig. Sie ist abhängig von der Lokalisation und Größe des Primarius, dem Sekretionsmuster, Wachstums- und Metastasierungsverhalten und dem Differenzierungsgrad. Ein Teil der Patienten weist Symptome der Produktion und Hypersekretion von Hormonen bzw. Neurotransmittern auf, wobei diese Tumoren als funktionell bezeichnet werden. Je nach Sekretionsprodukt sind die Symptome und Beschwerden sehr unterschiedlich, in einigen Fällen aber hochspezifisch. Demgegenüber verhalten sich nonfunktionelle Tumoren lange Zeit klinisch symptomlos und werden erst durch infiltrierendes, obstruierendes Wachstum oder Fernmetastasen, mit eventuell dadurch zunehmender Funktionalität, auffällig. Die Metastasierung erfolgt vorwiegend in mesenteriale Lymphknoten, Leber, Lunge und das Peritoneum, seltener in Knochen und Haut (Öberg 1994).

### **1.1.2.1. Epidemiologie**

Die Inzidenz neuroendokriner Tumoren wird mit 1-2/100000/Jahr angegeben. Männer und Frauen sind in etwa gleich häufig betroffen (Plöckinger et Wiedenmann 2004). Neuere Daten aus den USA dokumentieren allerdings einen deutlichen Anstieg der Inzidenz auf etwa 5,25/100000/Jahr. Angesichts der insgesamt günstigen Prognose der NETs liegt die Prävalenz deutlich über der Inzidenz, so dass hier Fallzahlen ähnlich dem kolorektalen Karzinom anzunehmen sind (Yao et al. 2008). Insgesamt überwiegen die funktionell inaktiven und hoch differenzierten neuroendokrinen Tumoren. Häufigste Lokalisation ist die Appendix vermiformis, in Sektionsstatistiken mit 80% der Dünndarm an erster Position (Plöckinger et Wiedenmann 2004). Neuroendokrine Tumoren des Pankreas sind mit einer Inzidenz von 0,05-0,2/100000/Jahr selten.

### **1.1.3. Klassifikation**

Das zunehmende Wissen über die Entwicklung und das biologische Verhalten von GEP-NETs durch fortschreitende Diagnostik und molekularbiologische Forschung bewirkte einen steten Wechsel der Terminologie neuroendokriner Tumoren. Der 1907 von Obendorf geprägte Begriff des Karzinoids reicht heute nicht mehr aus, um der morphologischen und biologischen Vielfalt im Spektrum der Neubildungen des neuroendokrinen Zellsystems gerecht zu werden. Er wurde daher 2000 von der WHO durch die neutralen und umfassenderen Termini neuroendokriner Tumor und neuroendokrines Karzinom ersetzt (Solcia et al. 2000, Klöppel et al. 2003). Eine aktuell noch gebräuchliche und übersichtliche Einteilung stellt die Klassifikation von Williams und Sandler (1963) nach den embryogenetischen Gesichtspunkten und der anatomischen Lokalisation in folgende drei Gruppen dar: 1.) Vorderdarntumore - Foregut (Respirationstrakt, Thymus, Ösophagus, Magen, Duodenum, Pancreas und proximales Jejunum bis zum Treitzschen Band im Versorgungsgebiet des Truncus coeliacus), 2.) Mitteldarntumore – Midgut (distales Jejunum, Ileum, Appendix, Coecum und Colon ascendens durch die Arteria mesenterica superior versorgt) und 3.) Enddarntumore - Hindgut (Colon transversum, Colon descendens, Sigma und Rectum im Einflussgebiet der Arteria mesenterica inferior) (modifiziert nach Plöckinger et Wiedenmann 2004). Während die Vorderdarntumoren häufig durch ihre Sekretionsprodukte und damit assoziierten Symptome/Syndrome gekennzeichnet sind, erscheinen die Hinterdarntumoren dagegen funktionell inaktiv, obwohl die Zellen unterschiedliche hormonelle Substanzen produzieren (Marc 1993, Plöckinger et

Wiedenmann 2004). Die NETs des Mitteldarms sind bei Vorliegen von Lebermetastasen funktionell aktiv und durch die Sekretion von beispielsweise Serotonin und Neurentensin B für das Karzinoidsyndrom verantwortlich (Plöckinger et Wiedenmann 2004). Je nach Vorliegen eines Hypersekretionssyndroms werden funktionelle von nicht funktionellen Tumoren unterschieden. Abschließend sei auf die Einteilung der ENETS bezüglich des Gradings abhängig von Mitoseaktivität und/oder Ki-67 in gut differenzierte NETs (G1 und G2) und schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome (G3) hingewiesen, welche die jüngste Klassifikation der WHO insbesondere im Hinblick auf eine prognostische Bewertung ergänzt (Rindi et al. 2006 und 2007).

#### **1.1.3.1. Histologische Typisierung**

Die konventionelle Färbung erfolgt mit Hämatoxylin-Eosin unter den Kriterien wie Morphologie (gut differenziert versus niedrig differenziert/undifferenziert) und Angioinvasion. Neuroendokrine Tumorzellen sind kleine Zellen mit regelmäßigem, rundem Zellkern. Sie exprimieren in unterschiedlicher Ausprägung neuronenspezifische Enolase (NSE), Synaptophysin und Chromogranin A (Kulke 2003, Van Gompel et al. 2004), die als Marker die neuroendokrine Differenzierung sichern und sich in der Routinediagnostik bewährt haben. Zusätzliche Information erbringt, wie bereits erwähnt, der prognostisch bedeutsame Proliferationsindex nach Ki-67-Färbung mit der neuen Einteilung in G1 (Ki-67 < 2%), G2 (Ki-67 3-20%) und G3 (Ki-67 > 20%) (Rindi et al. 2006 und 2007).

#### **1.1.3.2. Tumormarker**

Der Nachweis sezernierter Markermoleküle im Urin/Serum kann zur Diagnostik und Verlaufskontrolle eingesetzt werden. Als vergleichsweise präziser Marker gilt Chromogranin A (Ferrari et al. 1999). Bei funktionellen NETs findet sich im Urin häufig eine Erhöhung der 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIES) (Plöckinger et Wiedenmann 2004). Gegenwärtig werden diese Marker besonders in der Verlaufskontrolle von NETs erfolgreich eingesetzt.

#### **1.1.4. Allgemeine prognostische Faktoren**

Wie bereits erwähnt, stellt die Gruppe der GEP-NETs eine sehr heterogene Tumorentität dar. Dementsprechend ist ihr natürlicher Verlauf sehr unterschiedlich und

die prognostische Voraussage nach wie vor problematisch. Die Einschätzung der Prognose ist jedoch maßgebend für die Diskussion um eine angemessene, individuelle Therapie (Pape et al. 2004). In der Vergangenheit haben sich daher zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten diesem Thema gewidmet, wobei die Studienlage zum Teil widersprüchliche Ergebnisse zeigt. Nachfolgend soll ein Überblick über mögliche prognostische Faktoren gegeben werden. Unbestritten ist, dass die Prognose entscheidend von der Lokalisation, Größe und Infiltrationstiefe des Primarius abhängt (Plöckinger et Wiedenmann 2005). Durch Söreide et al. (2000) wurde dokumentiert, dass der klinische Verlauf von NET-Patienten vom Stadium der Erkrankung zum Zeitpunkt der Erstdiagnose abhängt. Demgegenüber zeigten Toth-Fejel und Pommier (2004), dass die Verzögerung der Diagnose nicht mit einer erhöhten Sterblichkeit einhergeht. Als demographisches Merkmal wird häufig versucht, das Alter in die Prognose mit einzubeziehen. Einige Studien zeigten eine ungünstigere Prognose mit zunehmendem Alter (Janson et al. 1997, Söreide et al. 2000). Ein weiteres Augenmerk wurde auf die Mitoseaktivität und den Proliferationsindex Ki-67 gelegt. Auch hier ist die Datenlage nicht eindeutig. Kawahara et al. (2002) konnten keine Korrelation zwischen dem Ki-67-Proliferationsindex und dem malignen Verhalten nachweisen. Andere Arbeiten belegen allerdings den Zusammenhang zwischen einem erhöhten Ki-67 und einer schlechteren Prognose sehr nachhaltig (De Manzoni et al. 1998, Kettenbach et al. 2003, Pape et al. 2004, Plöckinger et al. 2004). Diesbezüglich erscheint ein Ki-67 basiertes Grading sinnvoll (Rindi et al. 2006 und 2007). Des Weiteren wurden Ausmaß und Nachweis der Metastasierung, assoziierte Zweitmalignome, Angioinvasion, hormonelle Aktivität, Resezierbarkeit des Primarius, Karzinoidsyndrom, 5-HIES-Konzentration im Urin und die Höhe des Plasma-CgA-Spiegels als mögliche Prognosefaktoren diskutiert.

#### **1.1.4.1. Prognose**

Wie in 1.1.4. dargestellt, ist es schwierig, bezüglich der Prognose einheitliche Aussagen zu treffen. Insgesamt besteht für GEP-NETs eine bessere Prognose als für epitheliale Karzinome vergleichbarer Größe und Lokalisation. Für Vorder-, Mittel- und Hinterdarntumoren liegen die 5-Jahres-Überlebensraten (5-J-ÜLT) bei 45%, 61% und 72%. Liegen Fernmetastasen vor, verringern sich die entsprechenden Werte auf 18%, 30% und 19%. Die schlechteste Prognose weist der NET des Pankreas mit einer 5-J-ÜLT von 34% auf, die beste ein lokal beschränkter Appendix-NET mit 94% 5-J-ÜLT

(Modlin and Sandor 1997). Diese Zahlen sollten nur der groben Orientierung dienen, da auch hier die Datenlage sehr variiert.

### **1.1.5. Diagnostik**

Handelt es sich um das Vorliegen eines funktionell aktiven GEP-NET mit einhergehender Symptomatik, basiert die Diagnostik auf dem Nachweis der von dem Tumor sezernierten Hormone (Modlin and Tang 1997, Ricke et al. 2001). Darüber hinaus steht eine Vielzahl von bildgebenden Verfahren zur Verfügung, die sich in Sensitivität und Spezifität unterscheiden. Ein wertvolles Routineverfahren ist die abdominelle Sonographie. Sie kann durch Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie (SRS), Positronen-Emissions-Tomographie (PET) und Endosonographie ergänzt werden. Die in den letzten Jahren fortschreitende technische Entwicklung der MRT und CT ergibt Vorteile durch umfassendere Umgebungsdarstellung, insbesondere durch Kombination mehrerer Verfahren. Vervollständigung bringt die intraoperative Diagnostik. Insgesamt stellt anhand der aktuellen Datenlage die Kombination von SRS und MRT Abdomen derzeit die beste Diagnosestrategie in den meisten Fällen von GEP-NETs dar (Plöckinger et al. 2004).

### **1.1.6. Therapie**

Welche Art der Therapie bzw. Kombination zum Einsatz kommt, wird individuell entschieden und umfasst drei Grundprinzipien: 1.) Die chirurgische Exzision als einzige Möglichkeit mit kurativem Ansatz und das Tumordebulking (chirurgisch oder radiologisch interventionell) zur Reduktion von Tumormasse, Minderung der Hormonsekretion und damit verbundener Symptome (Öberg 1994, Plöckinger et Wiedenmann 2005). 2.) Die Biotherapie, insbesondere bei inoperablen Tumoren oder Lebermetastasierung eingesetzt, mit dem Ziel der Unterdrückung der Hormonaktivität zur Kontrolle/Linderung der Symptome, Erhaltung der Lebensqualität und fraglicher Beeinflussung des Tumorwachstums. Zum Einsatz kommen antihormonelle/antiproliferative Substanzen wie Somatostatinanaloga und IFN-alpha. Gut gesichert ist der Erfolg der Biotherapie für die Behandlung der Hypersekretionssymptome. Darüber hinaus konnte für metastasierte NETs kürzlich eine deutliche Verlängerung des progressionsfreien Überlebens gezeigt werden (Rinke et al. 2009). 3.) Die systemische oder lokale Chemotherapie zur Eindämmung des

Tumorwachstums. Während sie bei malignen NETs des Magens, Duodenums oder Dickdarms nur geringe Ansprechraten aufweist (Arnold and Frank 1996, Rougier and Mitry 2000, Syrigos et al. 2002), zeigt sie bei NETs des Pankreas einen therapeutischen Effekt mit partieller Remission und einer verlängerten Überlebenszeit (Arnold and Frank 1996, Öberg 1999, Rougier and Mitry 2000, Syrigos et al. 2002). Kürzlich sind mit Everolimus und Sunitinib zwei neue Wirkstoffe aus der Gruppe der „targeted therapies“ für die Behandlung pankreatischer NETs zugelassen worden, die in Phase III Studien überzeugende Wirksamkeit gezeigt haben (Raymond et al. 2011, Yao et al. 2011).

## **1.2. Angiopoietine**

### **1.2.1. Allgemeine Grundlagen**

Eine neue Gruppe von endothelial sezernierten Proteinen, als Angiopoietine benannt, wurde als Erstes von Yancopoulos und Kollegen identifiziert (Davis et al. 1996, Maisonpierre et al. 1997). Sie binden alle an den Tie-2-Rezeptor (Tie = tunica interna endothelial cell kinase), eine Rezeptortyrosinkinase, die von Endothelzellen exprimiert wird (Maisonpierre et al. 1997). Bis heute sind vier Vertreter (Ang-1 bis Ang-4) bekannt, von denen Ang-1 und Ang-2 am besten charakterisiert sind (Ahmad et al. 2001). Beides sind Proteine von ungefähr 75kDa, die eine bis zu 60% homologe Aminosäuresequenz aufweisen. Insgesamt wird den Angiopoietinen eine entscheidende Rolle sowohl in der physiologischen als auch in der pathologischen Angiogenese zugeschrieben. Während Ang-1 den Tie-2-Rezeptor nach Bindung aktiviert, inhibiert Ang-2 wahrscheinlich die Ang-1-induzierte Wirkung am Tie-2-Rezeptor (Tsigkos et al. 2003).

### **1.2.2. Angiopoietin-2 und sein molekularer Wirkmechanismus**

Ang-2 ist ein aus 496 Aminosäuren bestehendes glykosyliertes, sezerniertes Protein, welches von Endothelzellen gebildet wird (Fiedler et al. 2004). Die Bindung an den Tie-2-Rezeptor erfolgt über die C-terminale (fibrinogenähnliche) Domäne der Angiopoietine, die Oligomerisierung durch den N-terminalen „coiled-coil“-Bereich (Davis et al. 1996, Procopio et al. 1999). Nach Bindung eines Liganden folgt eine Dimerisierung des Tie-2-Rezeptors. Handelt es sich um einen aktivierten Liganden, wird die Rezeptortyrosinkinase anschließend autophosphoryliert und ein intrazellulärer Signalweg (PI3-K/Akt) aktiviert, welcher bis heute nicht vollständig bekannt ist. Es ist

belegt, dass Ang-1 seine antiapoptotische Wirkung darüber induziert, ebenfalls scheint die endotheliale Migration darüber beeinflusst zu werden (Kontos et al. 1998, Jones et al. 1999). Abseits des PI3-K/Akt-Signalwegs stehen mehrere andere Moleküle und zytoplasmatische Tyrosinkinase in Zusammenhang mit dem Tie-2-Rezeptor (Stelios et al. 2003). In Anbetracht der Vielfältigkeit der Signalübertragung ergeben sich unterschiedliche Einflüsse auf die Angiogenese, im Speziellen die in Tumoren, welche im folgenden Kapitel dargestellt werden. Hinsichtlich der Rolle von Ang-2 am Tie-2-Rezeptor besteht keine vollständige Klarheit. Übereinstimmend mit dem klassischen Konzept eines Antagonismus kann Ang-2 die Ang-1-induzierte Phosphorylierung inhibieren, wird Tie-2 jedoch an nicht endothelialen Zellen (transfizierte Fibroblasten) exprimiert, wirkt Ang-2 als Agonist zu Ang-1 (Maisonpierre et al. 1997). Ebenfalls zeigten andere Studien die Fähigkeit von Ang-2, Tie-2 an Endothelzellen zu phosphorylieren, abhängig von Konzentration, Ursprung (autokrin versus parakrin) und verlängerter Inkubation (Kim et al. 2000, Teichert-Kuliszewska et al. 2001, Gale et al. 2002).

### **1.2.3. Angiopoietin-2 und Tumor assoziierte Angiogenese**

Angiogenese, das heißt die Neubildung von Blutgefäßen, ist sowohl im Rahmen physiologischer Reifung als auch für die Tumorbiologie von grundsätzlicher Bedeutung. Eine besondere Rolle spielen in diesem Kontext Endothelzellen, die nur in einem komplexen Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmolekülen, Proteasen und extrazellulärer Matrix die Formation neuer Gefäße bewerkstelligen können. Entscheidende Mediatoren sind der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) und die Angiopoietine (Gale et Yancopoulos 1999, Carmeliet 2000, Tsigkos et al. 2003, Augustin et al. 2009). Die Rolle von Ang-2 im Rahmen der Tumorangiogenese ist nach wie vor Bestandteil kontroverser Diskussionen mit widersprüchlicher Studienlage. Eine erhöhte Ang-2-Konzentration konnte zweifelsfrei in verschiedenen Tumoren (siehe 1.2.4.) nachgewiesen werden. Ergebnisse bezüglich Ang-2-überexprimierender Modelle stellen sich unterschiedlich dar. Ang-2-Überexpression in Lungen- und Mammakarzinomzellen in der Maus führte zu Defekten der Blutgefäße, aggregierten Endothelzellen, einhergehend mit Zellapoptose, geringerer Metastasierung und Verlängerung der Überlebenszeit (Yu and Stamenkovic 2001). Dahingegen wiesen Mäuse mit implantierten Kolonkarzinomzellen und experimenteller Ang-2-Expression

größere und stärker vaskularisierte Tumoren auf (Ahmad et al. 2001). Ebenfalls führte die Ang-2-Überexpression im hepatozellulären Karzinom und Magenkarzinom zu schnellerem Tumorwachstum und einer höheren Gefäßzahl (Tanaka et al. 1999, Etoh et al. 2001). Möglicherweise entscheidend für den Ang-2-Effekt könnte die jeweilige Konzentration von VEGF sein. Ang-2 besitzt primär wohl eine Gefäß destabilisierende Wirkung. Im Zusammenspiel mit Ang-2 zeigten sich bei hohen VEGF-Konzentrationen Angiogenese und eine Expression von Matrixmetalloproteasen (eine der Voraussetzungen für Gefäßneubildung), während Ang-2 in Abwesenheit von VEGF zu Gefäßregression führte (Holash et al. 1999).

#### **1.2.4. Angiopoietin-2 in unterschiedlichen Tumorentitäten einschließlich der Bedeutung als prognostischer Faktor**

Zahlreiche Arbeitsgruppen konnten Ang-2 in unterschiedlichen Tumorentitäten nachweisen, sehr früh und eingehend in Hirntumoren wie dem Glioblastom und Astrozytom (Stratmann et al. 1998, Zagzag et al. 1999). Hier zeigte sich eine Überexpression in den Endothelzellen der Tumorgefäße. Ebenso ist in Tumoren der Leber (Tanaka et al. 1999, Mitsuhashi et al. 2003, Zhao et al. 2004, Zhong et al. 2006), des Magens (Etoh et al. 2001, Wang et al. 2005), des Darms (Ahmad et al. 2001, Chung et al. 2006, Wang et al. 2007), der Lunge (Takahama et al. 1999, Takanami 2004, Park et al. 2007) und der Prostata (Lind et al. 2005) Angiopoietin-2 als signifikant erhöht beschrieben worden. Dies gilt ebenso für maligne Erkrankungen der Niere (Currie et al. 2002), der Schilddrüse mit Ausnahme des papillären Karzinoms (Bunone et al. 1999), der Haut (Brown et al. 2000), des Ösophagus (Zhou et al. 2007) und bei der akuten myeloischen Leukämie (Watari et al. 2002). Kontroverse Daten existieren zum Nachweis von Ang-2 im Mammakarzinom (Currie et al. 2001 versus Sfiligoi et al. 2003). Von allgemeiner Bedeutung ist, dass Ang-2 in einigen der genannten Tumorentitäten nicht nur in Endothelzellen, sondern auch von Tumorzellen de novo exprimiert nachgewiesen werden konnte (Etoh et al. 2001, Currie et al. 2002, Watari et al. 2002, Sfiligoi et al. 2003, Nakayama et al. 2007). Methodisch gelang der Ang-2-Nachweis in den meisten Studien mittels relativ aufwändiger Verfahren wie RT-PCR, in situ Hybridisierung oder Northern Blot. Der ELISA mit Bestimmung der Ang-2-Serumkonzentrationen als wesentlich einfachere Methode, gerade im Hinblick auf die Einführung von Ang-2 als prognostischem Marker in der Klinik, wurde nur von

sehr wenigen Gruppen für das HCC (Scholz et al. 2007), Ösophagus squamosa cell carcinoma (Zhou et al. 2007), NSCLC (Park et al. 2007) und hämatologische Tumoren (Quartarone et al. 2006, Schliemann et al. 2007) eingesetzt und beschrieben. Hinsichtlich der prognostischen Relevanz des Angiopoietin-2 gibt es wenige und zum Teil ebenfalls konträre Daten. Ang-2-Expression korrelierte mit einem schlechteren Überleben im NSCLC (Takahama et al. 1999 und 2002), Prostatakarzinom (Lind et al. 2005) und bei der AML (Schliemann et al. 2007). Eine Korrelation mit anderen klinisch pathologischen Parametern zeigte sich für das Magenkarzinom (Etoh et al. 2001), HCC (Mitsuhashi et al. 2003) und Kolonkarzinom (Chung et al. 2006). Im Gegensatz dazu ließen sich solche Befunde für das CCC (Tang et al. 2006), in einer anderen HCC-Studie (Wada et al. 2006) und für das Mammakarzinom (Rmail et al. 2007) nicht erheben. Bei Schliemann et al. (2006) wurde für die oben bereits erwähnte AML sogar eine erhöhte Ang-2-Expression als Indikator für eine bessere Prognose angesehen. Diese Unterschiede könnten, wie bereits erwähnt, an unterschiedlichen Konzentrationen der Kofaktoren VEGF und Ang-1 liegen. Grundlegend ist zu erkennen, dass Angiopoietin-2 eine wichtige Rolle im Rahmen maligner Erkrankungen spielt und tendentiell eine ungünstige prognostische Relevanz beinhaltet. Zu Beginn der Promotionsarbeit lagen zur Rolle von Angiopoietin-2 bei gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren keine Daten vor, 2009 erschien allerdings eine Studie, die erhöhte zirkulierende Ang-2-Werte bei NET-Patienten dokumentiert (Srirajaskanthan et al. 2009.)

### **1.3. Ziel**

Neuroendokrine Tumoren stellen eine inhomogene Gruppe maligner Erkrankungen mit hoher Variabilität bezüglich des klinischen Verlaufs dar. Neue prognostische Parameter sind daher notwendig. Auf Grund der tumorbiologischen Bedeutung von Angiopoietin-2 sowie der unzureichenden Datenlage hinsichtlich der Relevanz für neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems war es das Ziel der Arbeit, Serum-Ang-2-Spiegel in dieser Tumorentität zu messen. Nach Untersuchung von möglichen Korrelationen mit klinischen und pathologischen Parametern sollte die Eignung von Angiopoietin-2 als Prognosefaktor in GEP-NETs beurteilt werden.

## **2. Material**

### **2.1. Blutproben**

Es wurden die Seren von 90 Patienten, die an einem neuroendokrinen Tumor des Gastrointestinaltrakts erkrankt sind, untersucht. Die Blutproben wurden aus der NET-Serumbank der Charité, Med. Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie, Campus Virchow-Klinikum, bezogen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Patienten hatten zuvor der Verwendung ihrer Blutproben und Daten zugestimmt.

### **2.2. Chemikalien**

Es kam der Quantikine Angiopietin-2-Immunoassay der Firma R&D Systems, Wiesbaden, zur Anwendung.

### **2.3. Patientencharakteristika**

Aus der NET-Serumbank der Charité, Med. Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie, Campus Virchow-Klinikum, wurden Proben von 90 Patienten zur Bestimmung der Ang-2-Serumspiegel ausgewählt. Bei 42 der 90 Patienten erfolgte die Blutentnahme 0 bis max. 3 Monate vor einer Resektion oder Probeentnahme. Die Seren dieser 42 Patienten wurden für die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen Ang-2-Serumspiegeln und klinisch pathologischen Parametern verwendet. Die klinisch pathologischen Parameter umfassten Primärlokalisierung, Funktionalität des Tumors, TNM-Stadium (ausschließlich histologische Diagnose), Lebermetastasierung (Einschluss histologischer und radiologischer Diagnostik), Lymph- und Angioinvasion, Grading (nach Rindi et al. 2006 und 2007) und CgA-Spiegel. Die 40 Serumproben der gesunden Kontrollgruppe stammten von Mitarbeitern der Forschungseinrichtungen der Charité oder von Blutspendern, welche keine relevanten Erkrankungen (bspw. Sepsis, Leberzirrhose, Malignome) hatten, so dass eine Ang-2-Interferenz diesbezüglich ausgeschlossen werden konnte.

Probennummer	Initialen	Geschlecht	Primarius	Alter bei Blutentnahme
1	E. A.	w	Pankreas	60
2	H-D. B.	m	Pankreas	63
3	P-J. B.	m	Pankreas	58
4	O. B.	m	Ileum	51
5	E. E.	m	Pankreas	53
6	D. Fr.	m	Duodenum	70
7	D. Fu.	m	Pankreas	55
8	C. G.	w	Ileum	64
9	E. Ge.	w	Ileum	60
10	E. Gu.	m	Pankreas	51
11	S. Z.	w	Ileum	49
12	M. H.	w	Ileum	59
13	K. H.	m	Ileum	63
14	S. J.	m	Pankreas	36
15	S. Kr.	w	Pankreas	48
16	S. Ki.	w	Pankreas	66
17	M-L. K.	w	Ileum	50
18	W. K.	m	Ileum	64
19	K-H. L.	m	Pankreas	70
20	B. M.	w	Pankreas	62
21	I. M.	w	Pankreas	68
22	H. M.	m	Pankreas	55
23	R. N.	m	Pankreas	56
24	G. N.	w	Pankreas	45
25	R. P.	m	Pankreas	55
26	M. Sz.	w	Pankreas	63
27	H. Scho.	w	Pankreas	47
28	H. Schr.	m	Duodenum	58
29	P. S.	m	Pankreas	46
30	H. W.	w	Pankreas	59
31	I. Z.	w	Pankreas	51
32	I. G.	w	Pankreas	45
33	G. M.	w	Pankreas	72
34	T. S.	m	Pankreas	38
35	W. B.	m	Ileum	72
36	A. G.	m	Ileum	35
37	H. H.	m	Ileum	67
38	A. K.	w	Zoekum	65
39	R. L.	m	unbekannt	61
40	J. P.	m	unbekannt	65
41	F-P. R.	m	Ileum	58
42	A. Z.	w	Pankreas	24

**Tabelle 1: Probennummer, Initialen, Geschlecht, Primarius und Alter der in der Studie eingeschlossenen Patienten**

## **3. Methoden**

### **3.1. Human Angiopoietin-2-Immunoassay**

#### **3.1.1. Allgemeines**

Der verwendete Quantikine Angiopoietin-2-Immunoassay der Firma R&D Systems nutzt die quantitative Sandwich Enzym Immunoassay Technik. Dabei wird zunächst von einem auf der Mikrotiterplatte befestigten monoklonalen Maus-Antikörper Ang-2 aus den Proben gebunden. Mit Hilfe eines zweiten enzymgebundenen monoklonalen Maus-Antikörpers wird dann das gebundene Ang-2 detektiert und colorimetrisch quantifiziert. Als Ang-2-Standard fungiert rekombinantes humanes Angiopoietin-2. Beide Ang-2-Antikörper werden vom Hersteller als spezifisch bewertet. Zum Ausschluss möglicher Interaktionen mit löslichen Rezeptoren, Bindungsproteinen und anderen Bestandteilen in biologischen Proben wurde der ELISA vom Hersteller auf Kreuzreaktivität und Interferenz bezüglich zahlreicher Faktoren (bspw. rhAng-1, rhTie-2, rhTNF-alpha, rhTNF-beta, rhVEGF) geprüft. Es konnten keine signifikanten Kreuzreaktionen oder Interferenzen nachgewiesen werden. Im betreuenden Labor wird der Assay seit mehreren Jahren durchgeführt. Bei Verwendung unterschiedlicher Chargen wurde dabei für die Inter-Assay Variabilität ein Variationskoeffizient von 9,87% ermittelt. Bei Doppelbestimmungen betrug die Abweichung in der Regel unter 10%. Die Linearität der Ang-2-Konzentrationsbestimmung im Serum wurde vom Hersteller über einen Verdünnungsbereich von 1:5 bis 1:40 geprüft, wobei im Mittel 95% der errechneten Konzentration gemessen wurde. In der hier vorgelegten Arbeit wurden die Serumproben in einer Verdünnung von 1:10 gemessen. Als untere Nachweisgrenze für Ang-2 wird eine Konzentration von 8,29pg/ml angegeben. In den gemessenen Seren lag der niedrigste Messwert bei 883pg/ml und somit auch bei Berücksichtigung der 1:10 Verdünnung sicher oberhalb der Nachweisgrenze, so dass sich aus der Sensitivität des Assays bei den hier durchgeführten Untersuchungen keine Limitation ergab.

#### **3.1.2. Vorbereitung/Aufbereitung der Reagentien, Proben und Standards**

Zu Beginn wurden alle Reagentien auf Raumtemperatur gebracht. Zum Herstellen des Wash Buffer war darauf zu achten, dass sich die Kristalle des ursprünglich bei 2-8°C

aufbewahrten Wash Buffer Concentrate vollständig lösten. Danach wurden 20ml des Konzentrats mit 480ml destilliertem Wasser verdünnt. Das ergab 500ml Wash Buffer. Die Substrat Solution wurde maximal 15 Minuten vor Gebrauch zu gleichen Teilen aus Color Reagent A (12,5ml) und Color Reagent B (12,5ml) geschützt vor Licht zubereitet. Der Angiopoietin-2-Standard wurde mit 1ml destilliertem Wasser versetzt. Das ergab eine Stammlösung mit einer Konzentration von 30000pg/ml. Daraus wurden 100µl in ein neues Röhrchen eingebracht. Dieses galt mit einer Konzentration von 3000pg/ml als Positivkontrolle, das native Calibrator Diluent RD5-5 als Negativkontrolle. Danach wurden 900µl des Calibrator Diluent RD5-5 in das 3000pg/ml-Röhrchen pipettiert. Folgend wurden je 500µl Calibrator Diluent RD5-5 auf sechs weitere Röhrchen verteilt. Um eine Reihe absteigender Konzentration (1500pg/ml, 750pg/ml, 375pg/ml, 187,5pg/ml, 93,7pg/ml, 46,9pg/ml) zu erreichen, wurden nach vorherigem Mischen je 500µl von einem Röhrchen zum nächsten transferiert, beginnend bei der Konzentration 3000pg/ml. Die Patientenproben erhielten durch Hinzufügen des Calibrator Diluent RD5-5 eine Verdünnung von 1:10.

### **3.1.3. Durchführung des Ang-2-ELISA**

Es wurden 100µl Assay Diluent RD1-76 in jedes well eingebracht. Dazu wurden 50µl der Standardreihe unterschiedlicher Konzentrationen (siehe oben), die Negativkontrolle (Calibrator Diluent RD5-5) und die aufbereiteten Blutseren pro well verteilt. Daraufhin erfolgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Shaker, nach dem die Mikroplatte mit adhaesive strips geschützt wurde. Anschließend wurde die Aspiration pro well und viermalige Waschung (400µl Wash Buffer pro well und Entfernen dessen) vorgenommen. Nach der letzten Waschung wurde die Mikroplatte ausgeschlagen. 200µl Angiopoietin-2-Conjugate wurden jetzt jedem well beigefügt mit einer erneut folgenden zweistündigen Inkubation nach Schutz der Mikroplatte durch adhaesive strips bei Zimmertemperatur. Es wiederholten sich in den folgenden Arbeitsschritten die Aspiration und viermalige Waschung. Zum Schluss wurden in jedes well 200µl Substrat Solution eingebracht, 30 Minuten bei Zimmertemperatur unter Lichtschutz inkubiert, und die Reaktion mit 50µl Stop Solution/well beendet. Abschließend erfolgte innerhalb einer Zeitspanne von 30 Minuten die Ablesung bei 450nm. Es befanden sich sämtliche Messwerte im Bereich der Standardkurve (46,9 bis 3000pg/ml).

### **3.2. Statistische Analyse**

Die Berechnung der Daten erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism. In den Graphiken werden alle Messwerte als Scatter dot plot einschließlich der Mediane und der Interquartilsabstände dargestellt.

Zur Analyse der Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

Zum Vergleich von mehr als zwei Gruppen kam in dieser Arbeit der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz. Als Post-Test diente der Dunn's-Multiple-Comparison-Test.

Für die Analyse einer Korrelation zwischen Serum-Ang-2 und Serum-CgA wurde bei Annahme einer fehlenden Normalverteilung der Spearman-Test angewendet und der Korrelationskoeffizient  $r$  angegeben.

Die Überlebenszeitanalyse erfolgte mittels der Kaplan-Meier-Überlebenskurve und dem Log-Rank-Test. Zuvor war eine Einteilung in eine Gruppe mit niedrigem oder normalem Serum-Ang-2 ( $< 75\%$ -Perzentile) und eine Gruppe mit hohem Serum-Ang-2 ( $\geq 75\%$ -Perzentile) erfolgt. Es werden diesbezüglich nachfolgend die Hazard Ratio, das 95%-Konfidenzintervall und der p-Wert angegeben.

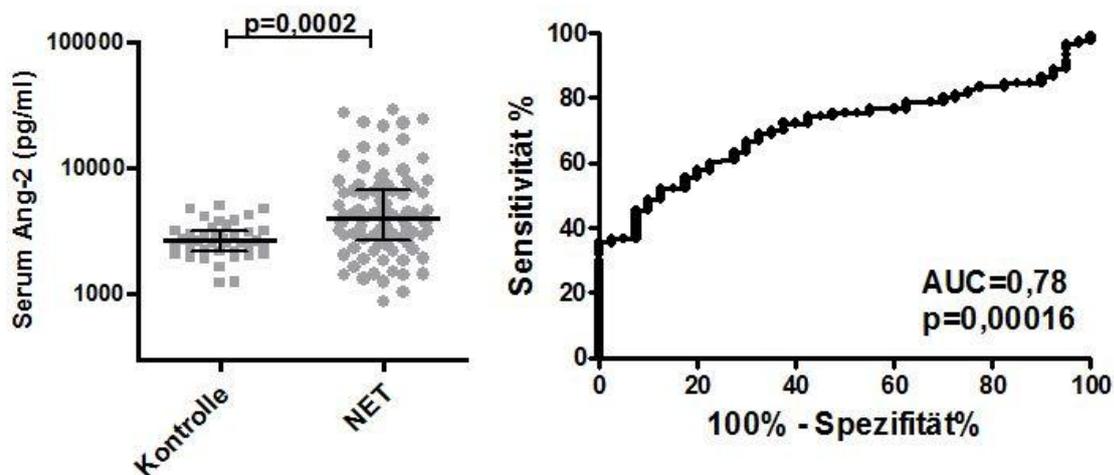
In allen Tests wurden Unterschiede ab einem p-Wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet. Ab einem p-Wert  $< 0,01$  wurden die Ergebnisse als statistisch hoch signifikant bezeichnet.

Multivariate Analysen wurden auf Grund limitierter Gruppengrößen und der nicht primär statistischen Intention dieser Arbeit nicht durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

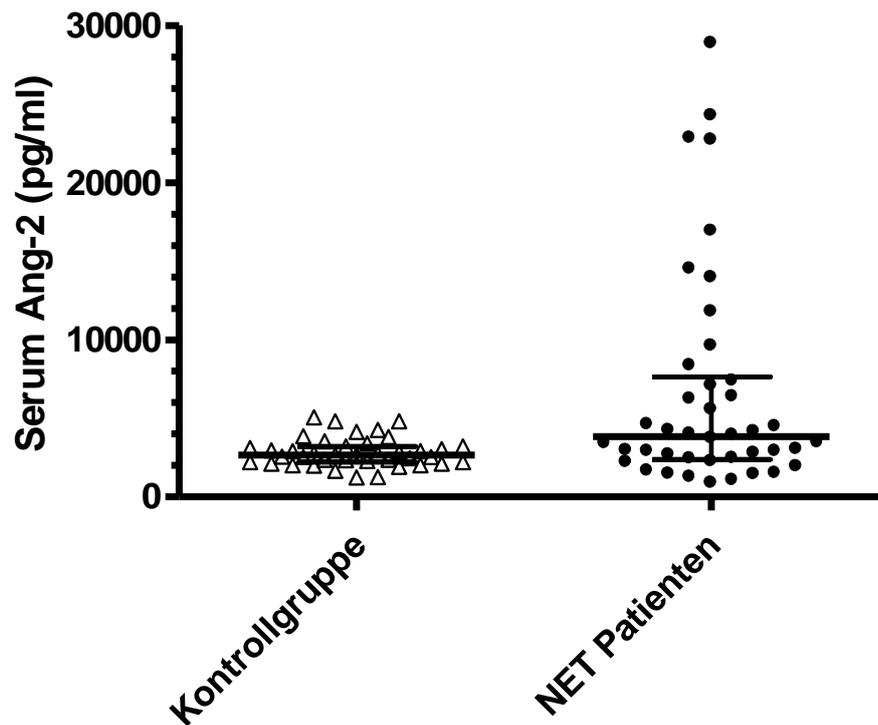
### 4.1. Angiotensin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten

Initial wurden mittels des in Kapitel 3 beschriebenen ELISA die Ang-2-Serumspiegel bei 90 an einem GEP-NET erkrankten Patienten bestimmt und mit den Werten von 40 gesunden Kontrollprobanden verglichen. Hierbei zeigten sich deutlich erhöhte Ang-2-Serumspiegel bei den NET-Patienten (4048pg/ml vs. 2650pg/ml,  $p < 0,001$ ). Gleichzeitig dokumentiert die Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve, dass der Ang-2-Spiegel als diagnostischer Test signifikante Trennschärfe für die Unterscheidung von Gesunden und NET-Patienten aufweist. Somit erschienen weitere Untersuchungen und die Korrelation mit klinisch pathologischen Parametern interessant und aussichtsreich.



**Abbildung 1: Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten (n=90) vs. Kontrollgruppe.** Linksseitig Darstellung aller Messwerte als Scatter dot plot sowie des Medians und des Interquartilsabstands. Rechtsseitig Darstellung der Receiver Operating Characteristic (ROC)-Kurve.

Bei den nachfolgenden Analysen wurde eine Subgruppe von 42 Patienten berücksichtigt, bei denen die Blutentnahme 0 bis max. 3 Monate vor einer Resektion oder Probeentnahme erfolgte. Der Median der Ang-2-Serumspiegel dieser 42 Patienten entsprach mit 3833 pg/ml dem Wert der zuvor untersuchten 90 Patienten und der Unterschied zur Kontrollgruppe war ebenfalls statistisch hoch signifikant ( $p=0,0085$ ).

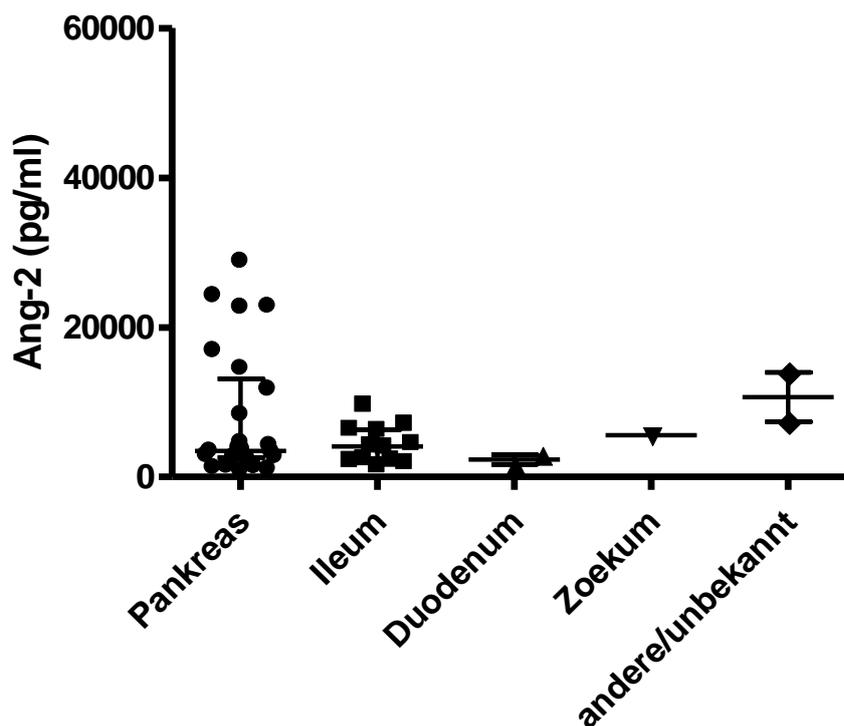


**Abbildung 2: Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten (n=42) vs. Kontrollgruppe.**  
Darstellung aller Messwerte als Scatter dot plot sowie des Medians und des Interquartilsabstands.

Nachdem somit eine Erhöhung des Serum-Ang-2-Spiegels bei NET-Patienten gezeigt werden konnte, sollte im Folgenden versucht werden, über Korrelationen mit klinischen und pathologischen Parametern Hinweise auf eine mögliche Bedeutung von Serum-Ang-2 bei NET-Patienten zu gewinnen.

## 4.2. Angiopoietin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit von der Primärlokalisierung

Zunächst sollte untersucht werden, ob der Serum-Ang-2-Spiegel in Abhängigkeit von der Lokalisation des Primärtumors differiert. Bei 25 der NET-Patienten lag dieser im Pankreas, bei 12 Patienten im Ileum, bei zwei Patienten im Duodenum, einmal im Zoekum und zweimal war die Primärlokalisierung nicht sicher zuzuordnen (siehe Tabelle 1). Ein aussagekräftiger Vergleich war hier nur zwischen den Lokalisationen Pankreas und Ileum möglich, wobei kein signifikanter Unterschied vorlag. (Pankreas 3458pg/ml, Ileum 4085pg/ml, Duodenum 2308pg/ml, Zoekum 5550pg/ml, Primärlokalisierung nicht sicher zuzuordnen 10669pg/ml, Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Multiple-Comparison-Post-Test). Auch bei Zusammenfassung der Foregut Tumore ergab sich kein Unterschied gegenüber der Midgut Gruppe.

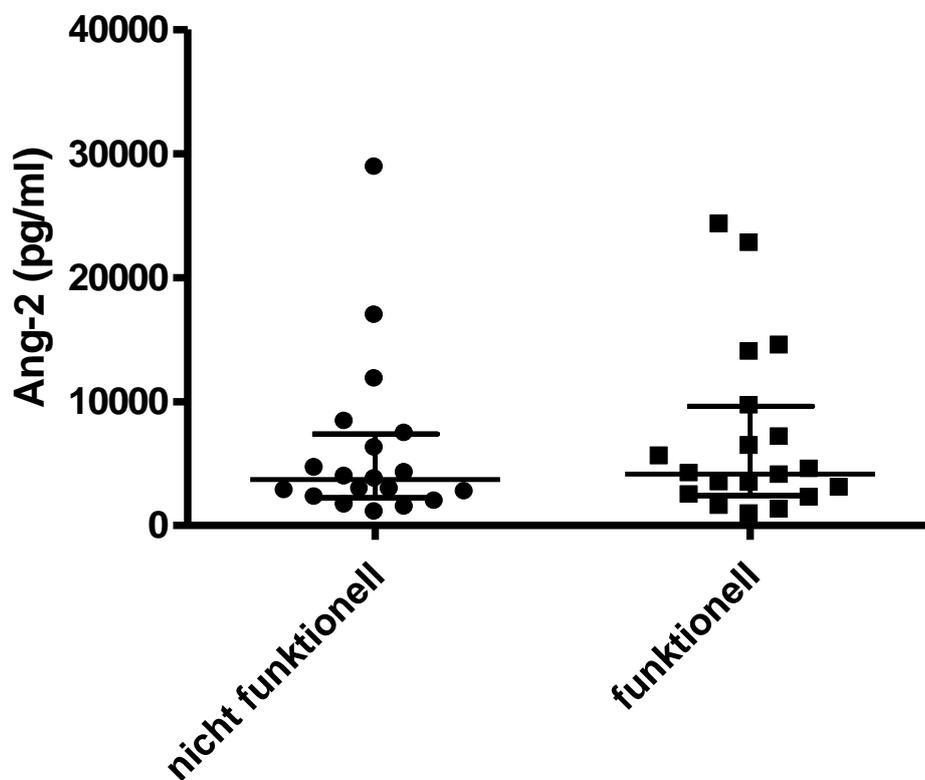


**Abbildung 3: Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit von der Primärlokalisierung.**

Darstellung aller Messwerte als Scatter dot plot sowie des Medians und des Interquartilsabstands.

### 4.3. Angiopoietin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit von der Funktionalität

In diese Analyse konnten 38 Patientendaten eingeschlossen werden. 4 Patienten (Nr. 6, 14, 22 und 24) wurden ausgeschlossen, da über die Funktionalität des Tumors keine eindeutige Aussage vorhanden war. 19 Patienten hatten einen funktionellen NET, 19 einen NET, der nicht funktionell war. Im Vergleich ließ sich kein signifikanter Unterschied der Ang-2-Serumspiegel nachweisen (4158pg/ml vs. 3733pg/ml,  $p=0,5791$ ).



**Abbildung 4: Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit von der Funktionalität.**

Darstellung aller Messwerte als Scatter dot plot sowie des Medians und des Interquartilsabstands.

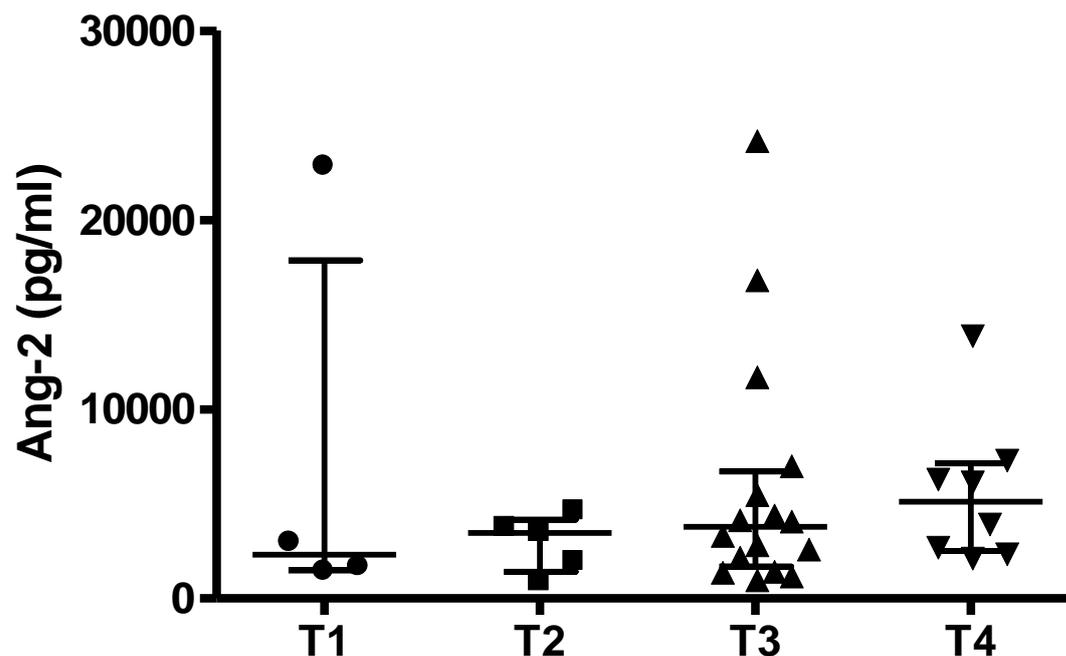
Nach der Charakterisierung bezüglich der Primärlokalisierung sowie der Funktionalität sollten im Anschluss die Parameter der TNM-Klassifikation hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf den Serum-Ang-2-Spiegel untersucht werden.

#### 4.4. Angiopoietin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten unterschiedlicher TumorgroÙe

Insgesamt 33 Patienten (von 9 Patienten war das T-Stadium unbekannt) wurden nach ihrer PrimærtumorgroÙe in folgende vier Gruppen eingeteilt:

- Gruppe T1 mit n=4 (Nr. 6, 14, 24 und 28)
- Gruppe T2 mit n=5 (Nr. 7, 11, 16, 19 und 27)
- Gruppe T3 mit n=16 (Nr. 3, 4, 9, 10, 17, 18, 20-22, 25, 30, 33-35, 38 und 42)
- Gruppe T4 mit n=8 (Nr. 8, 13, 23, 36, 37, 39-41)

Beim Vergleich der Ang-2-Serumspiegel dieser 4 Gruppen zeigten sich keine Unterschiede (T1 2308pg/ml, T2 3458pg/ml, T3 3783pg/ml, T4 5119pg/ml, Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's-Multiple-Comparison-Post-Test,  $p=0,6145$ ).

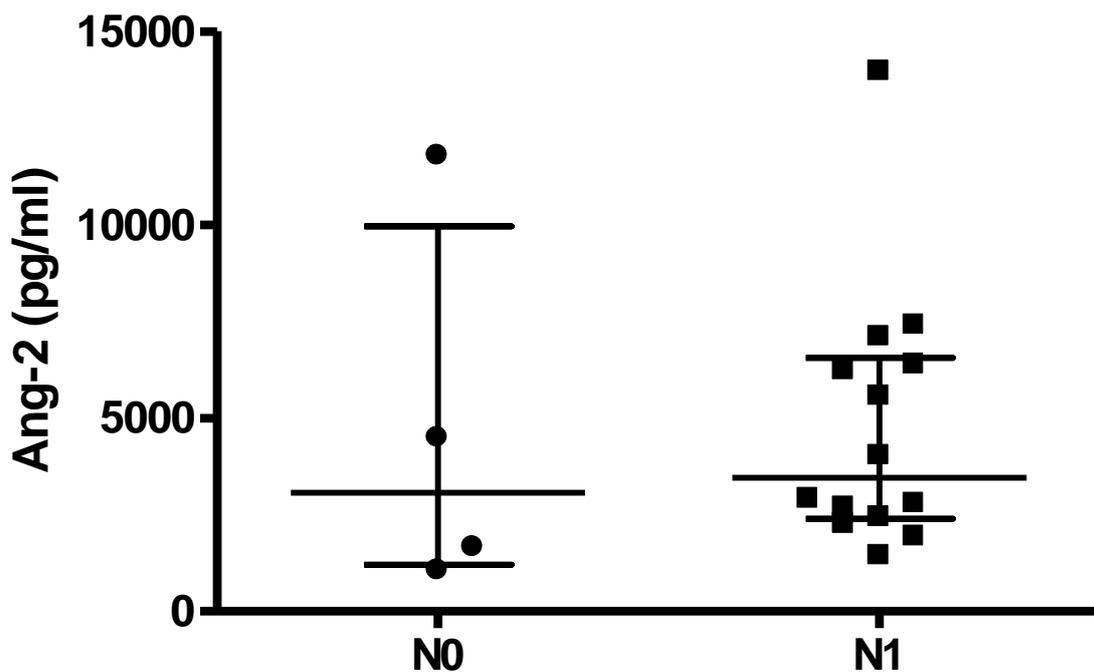


**Abbildung 5: Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten unterschiedlicher TumorgroÙe (T1 bis T4).**

Darstellung aller Messwerte als Scatter dot plot sowie des Medians und des Interquartilsabstands.

#### 4.5. Angiopoietin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit vom N-Status

Auf Grund von zum Teil inkompletten Unterlagen mit fehlenden bzw. unvollständigen pathologischen Befunden der Resektate lag nur für 18 Patienten ein korrekt kodierter N-Befund vor. Es wurden nur Patientendaten untersucht, deren N-Stadium als eindeutig histologisch gesichert nachgewiesen werden konnte. Dabei waren 4 NET-Patienten im Stadium N0, 14 im N1-Stadium. Die Medianwerte betragen 3071pg/ml vs. 3460pg/ml. Es ist festzuhalten, dass auch Patienten ohne Nachweis von Lymphknotenmetastasen erhöhte und sehr hohe Ang-2-Serumspiegel zeigen können. Ein statistischer Vergleich der beiden Gruppen erschien auf Grund der geringen Fallzahlen in der Gruppe N0 jedoch nicht aussagekräftig.

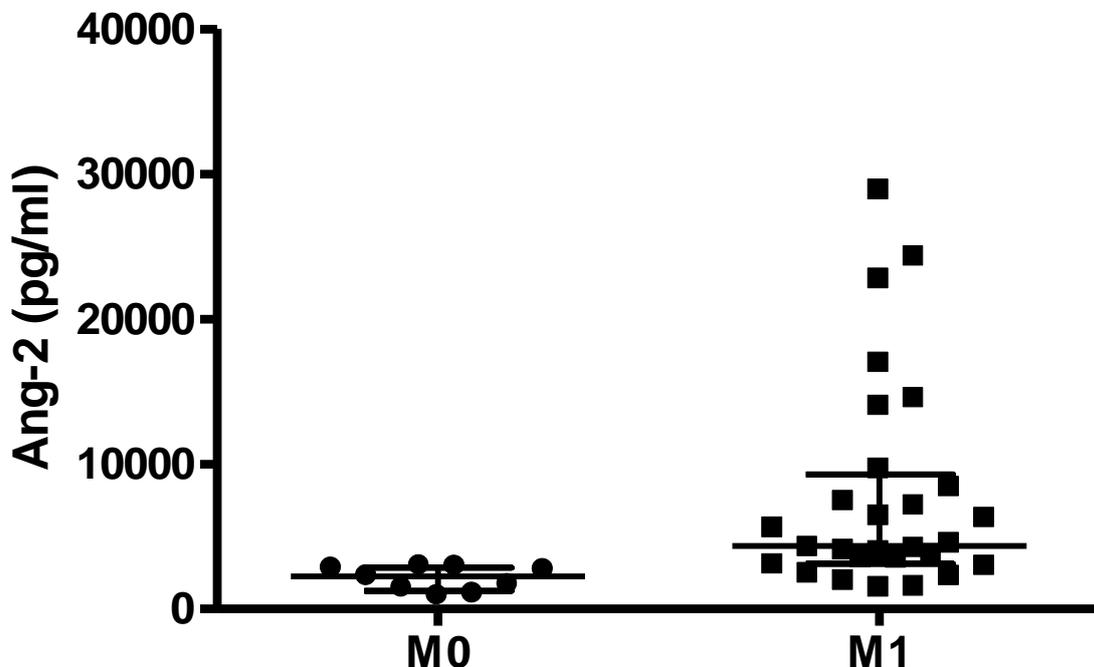


**Abbildung 6: Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit vom N-Status.**

Darstellung aller Messwerte als Scatter dot plot sowie des Medians und des Interquartilsabstands.

#### 4.6. Angiopoietin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten mit Metastasierung, im Speziellen mit Leberfiliae

Es erfolgte der Vergleich von 37 Patienten in einer Gegenüberstellung M1 (n=28) versus M0 (n=9). Es konnte ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden ( $p=0,0005$ ). Der mediane Ang-2-Serumspiegel in Gruppe M1 betrug 4358pg/ml gegenüber 2258pg/ml in der Gruppe M0. Interessanterweise unterschieden sich die Ang-2-Serumspiegel von NET-Patienten ohne Vorliegen von Metastasen nicht von den Werten des gesunden Kontrollkollektivs ( $p=0,0727$ ).

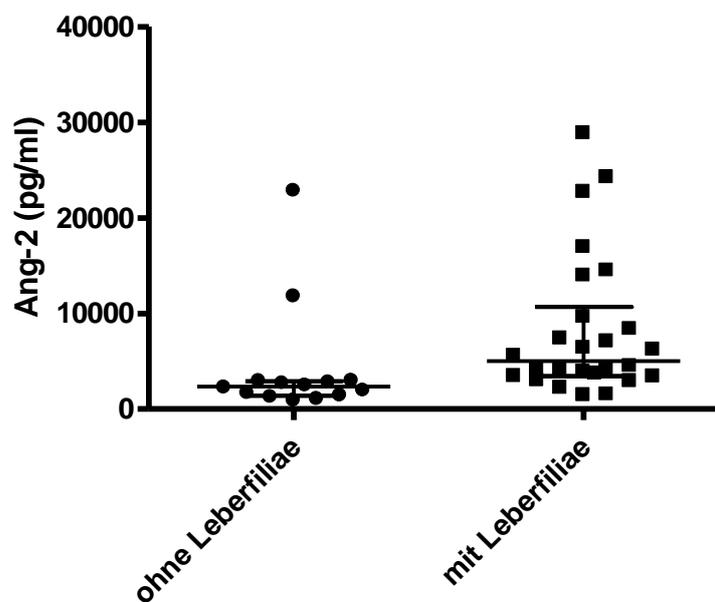


**Abbildung 7: Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit von der Metastasierung.**

*Darstellung aller Messwerte als Scatter dot plot sowie des Medians und des Interquartilsabstands.*

Mit Hinblick auf diesen Befund ist allerdings zu erwähnen, dass bei 26 der 28 Patienten der Gruppe M1 Leberfiliae vorlagen, da die Leber einen der primären Metastasierungswege GEP-NETs repräsentiert. Somit erlauben die Ergebnisse keine Aussage zur Veränderung von Ang-2-Serumspiegeln bei extrahepatischer Metastasierung, sondern spiegeln in diesem Fall den Effekt hepatischer Metastasierung wieder.

Um diese Annahme zu prüfen, wurde eine Analyse der Ang-2-Serumspiegel für die Subgruppe der Patienten mit bzw. ohne Leberfiliae angeschlossen. 14 der NET-Patienten wiesen keine Lebermetastasen zum Zeitpunkt der Blutentnahme auf. 2 Patienten (Nr. 8 und 19) wurden auf Grund fehlender Aussagen bezüglich der Leber ausgeschlossen. Mit 5017pg/ml war der Median der NET-Patienten mit Leberfiliae höher als der, der NET-Patienten ohne Leberbeteiligung mit 2358pg/ml. Bei einem p-Wert von 0,0012 war dies ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen, womit die zuvor erhobenen Daten bezüglich des Zusammenhangs zwischen Ang-2-Serumspiegeln und Metastasierung bestätigt und auf das Vorliegen von Leberfiliae präzisiert wurden. Eine sinnvolle Subgruppenanalyse „Lebermetastasierung“ vs. „M1 ohne Leberbeteiligung“ konnte auf Grund der großen Seltenheit dieser klinischen Situation nicht durchgeführt werden.

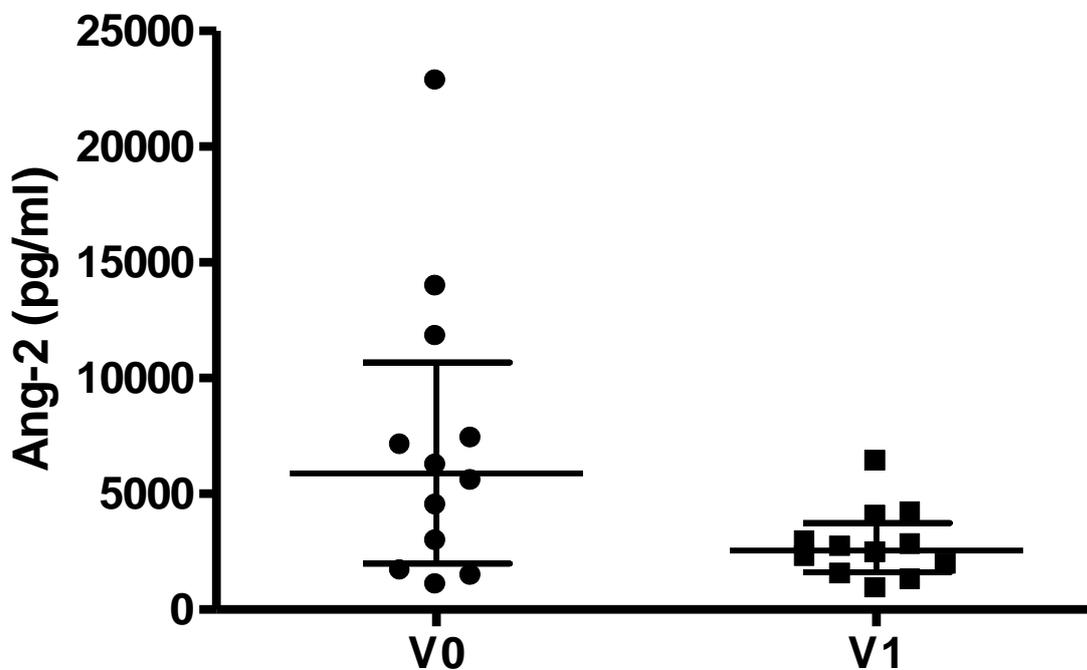


**Abbildung 8: Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten ohne versus mit Leberfiliae.** Darstellung aller Messwerte als Scatter dot plot sowie des Medians und des Interquartilsabstands.

Nach Abschluss der Untersuchungen bezüglich des TNM-Stadiums wurden weiterhin die prognostisch relevanten histologischen Parameter Angioinvasion, Lymphangioinvasion und Proliferationsrate auf Unterschiede in den Serum-Ang-2-Spiegeln untersucht.

#### 4.7. Angiotensin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten mit Angioinvasion

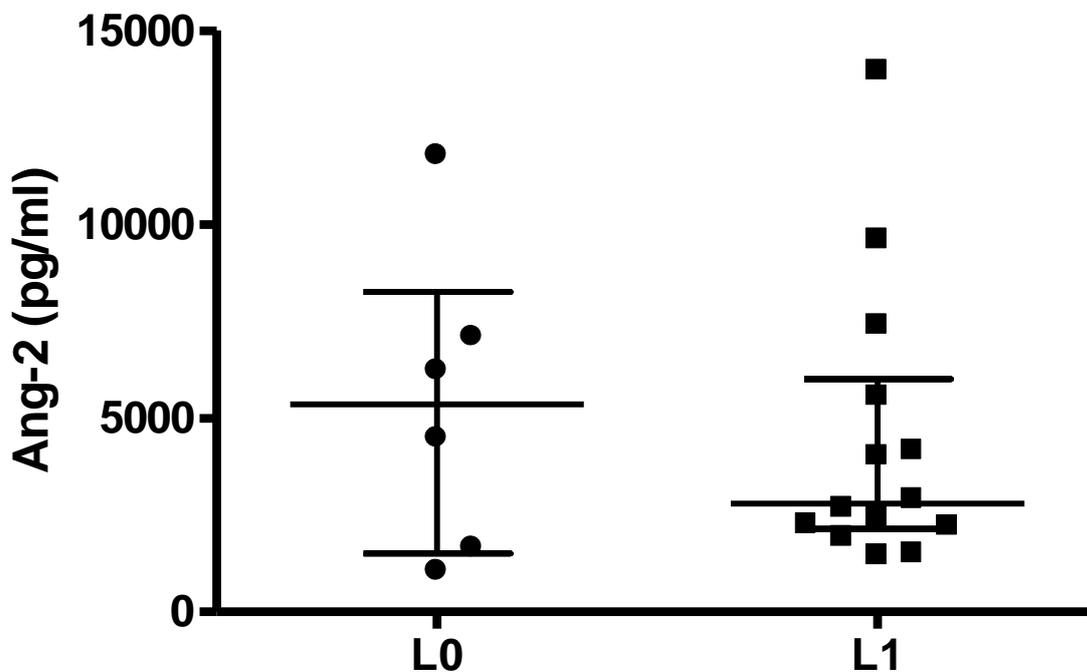
Diese Untersuchung widmete sich der Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dem Ang-2-Serumspiegel und der Gefäßinfiltration besteht. Zur Auswertung kamen Blutproben von 24 Patienten (Nr. 3, 4, 6, 8-11, 17, 18, 21, 23, 24, 27, 28, 33, 34, 35-42). Die restlichen Patienten wurden wie in den vorherigen Betrachtungen auf Grund fehlender Daten ausgeschlossen. Dabei betrug in der Gruppe V1 n=12 und in der Gruppe V0 n ebenfalls 12. Patienten ohne Angioinvasion zeigten mit 5888pg/ml einen höheren Wert als in Gruppe V1 mit 2558pg/ml ( $p=0,0404$ ).



**Abbildung 9: Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten ohne und mit Angioinvasion.** Darstellung aller Messwerte als Scatter dot plot sowie des Medians und des Interquartilsabstands.

#### 4.8. Angiotensin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten mit Lymphangiainvasion

Hier wurden die Ang-2-Serumspiegel von 20 Patienten (Nr. 3, 4, 8, 9, 10-13, 17, 18, 28, 33-40, 42) verglichen. 14 dieser Patienten wiesen Lymphangiainvasion auf (L1), während die anderen 6 als Negativkontrolle dienten (L0). Die restlichen Patienten konnten nicht eingeschlossen werden, da es sich bei ihnen um ein unbekanntes L-Stadium handelte. Der mediane Ang-2-Serumspiegel bei Patienten ohne Lymphgefäßinvasion (L0) lag höher als in der Gruppe L1 (5354 pg/ml vs. 2796 pg/ml), allerdings erreichte der beobachtete Unterschied nicht das Niveau statistischer Signifikanz ( $p=0,7105$ ).

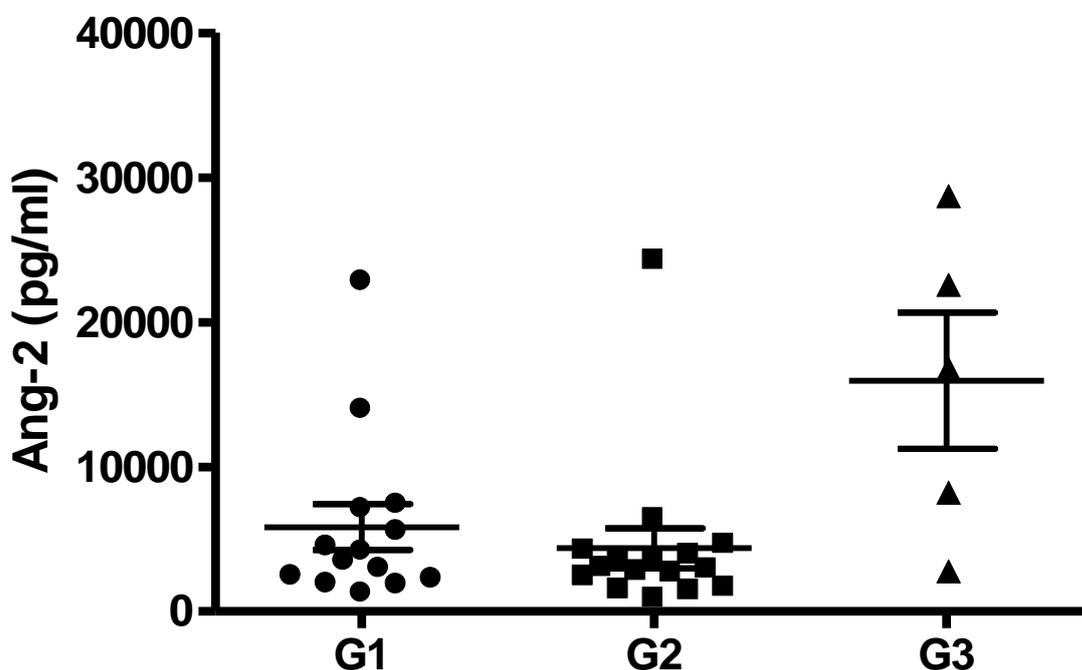


**Abbildung 10: Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten ohne und mit Lymphangiainvasion.**

Darstellung aller Messwerte als Scatter dot plot sowie des Medians und des Interquartilsabstands.

#### 4.9. Angiotensin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit vom Tumorgrading

Basierend auf den aktuellen Empfehlungen der ENETS zum Grading neuroendokriner Tumoren mittels Ki-67-Färbung erfolgte eine Einteilung von 35 auswertbaren Patienten in die Gruppen G1 (n=14), G2 (n=16) und G3 (n=5). Es zeigten sich in der Gruppe G3 signifikant erhöhte Ang-2-Serumspiegel (G1 3808pg/ml, G2 2971pg/ml, G3 16908pg/ml, G3 vs. G2  $p=0,0451$ , G3 vs. G1  $p=0,0276$ , G3 vs. G1/G2  $p=0,018$ ).

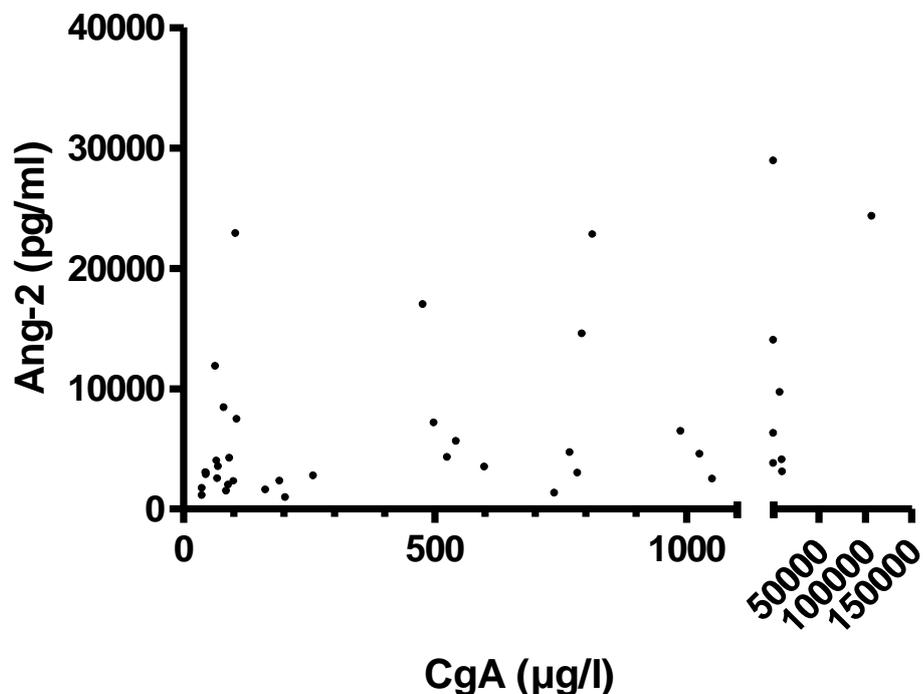


**Abbildung 11: Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit vom Tumorgrading.**

Darstellung aller Messwerte als Scatter dot plot sowie des Medians und des Interquartilsabstands.

#### 4.10. Korrelation der Angiotensin-2-Serumspiegel bei NET-Patienten mit den Chromogranin-A-Serumspiegeln

Chromogranin-A-(CgA)-Serumspiegel sind bei NET-Patienten als Tumormarker etabliert. Daher stellte sich die Frage, ob die Höhe des Angiotensin-2 im Serum mit dem CgA-Serumspiegel bei Patienten mit einem NET korrelieren könnte. Es wurden die Befunde von 41 Patienten ausgewertet. Nr. 34 wies keinen parallel entnommenen CgA-Wert auf und wurde somit ausgeschlossen. Es konnte mittels Spearman-Analyse belegt werden, dass die Höhe der Ang-2-Serumspiegel positiv mit den CgA-Spiegeln korreliert. Dabei ist der Korrelationskoeffizient  $r$  mit einem Wert von 0,4370 zwar relativ niedrig, er ist im statistischen Sinne aber dennoch signifikant ( $p=0,0043$ ).

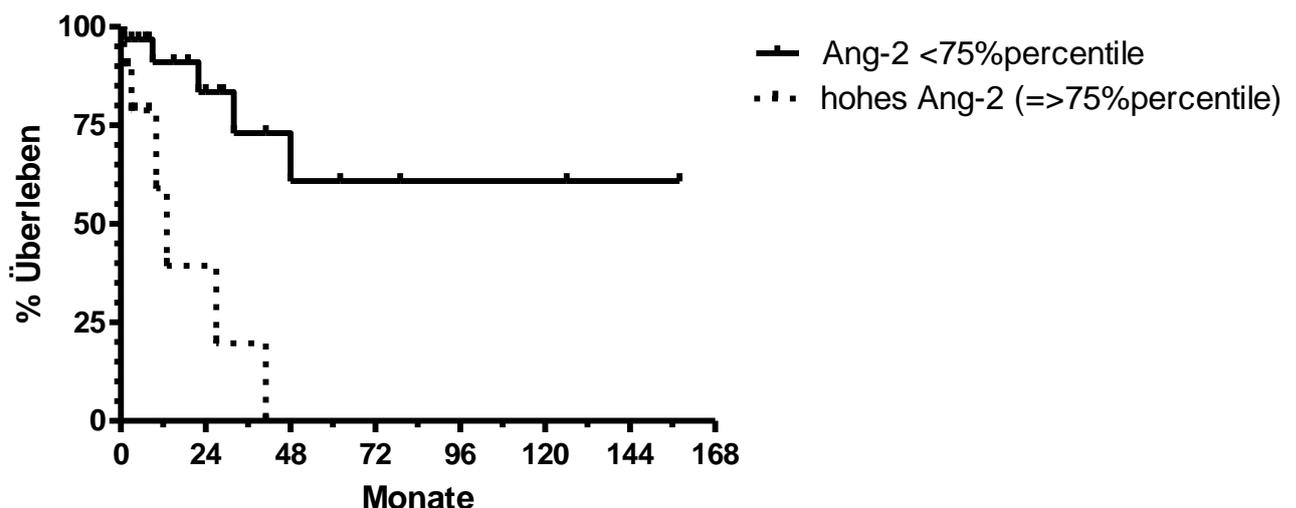


**Abbildung 12: Ang-2-Serumspiegel in Abhängigkeit vom CgA-Serumspiegel bei NET-Patienten.**

*Dargestellt sind alle Messwerte. X-Achse mit Achsensprung.*

#### 4.11. Überlebenswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit des Angiotensin-2-Serumspiegels

Abschließend wurden 41 in die Studie eingeschlossene NET-Patienten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Ang-2-Serumspiegel und Überlebensdauer/-wahrscheinlichkeit untersucht. Es sollte so die Möglichkeit, den Ang-2-Serumspiegel als prognostischen Faktor zu bewerten, geprüft werden. Hierfür wurden die Patienten nach der Höhe ihres Ang-2-Serumspiegels in eine Gruppe mit niedrigem oder durchschnittlichem medianen Ang-2-Wert ( $< 75\%$ -Perzentile) und eine Gruppe mit hohem Ang-2-Wert ( $\geq 75\%$ -Perzentile) aufgeteilt. 31 Patienten gehörten zur Gruppe mit niedrigen bzw. durchschnittlichen Ang-2-Werten, 10 Patienten zur Gruppe mit hohen Ang-2-Werten. In der Gruppe mit hohem Ang-2 traten im Untersuchungszeitraum sechs Todesfälle auf, in der Vergleichsgruppe wurden fünf Todesfälle beobachtet. Insgesamt war die Überlebensrate in der Gruppe mit niedrigen oder durchschnittlichen Ang-2-Werten hoch signifikant besser als in der Gruppe der Patienten mit hohen Ang-2-Werten. Der p-Wert betrug 0,0006. Die Hazard ratio ergab einen Wert von 0,05801 (95%-Konfidenzintervall 0,01148 – 0,2930). Die mediane Überlebenszeit der Patienten mit hohem Ang-2-Serumspiegel ( $\geq 75\%$ -Perzentile) betrug 13 Monate, in der Gruppe mit niedrig/durchschnittlichem Ang-2-Serumspiegel ( $< 75\%$ -Perzentile) wurde dieser Wert noch nicht erreicht.



**Abbildung 13: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier von NET-Patienten mit niedrig/ durchschnittlichem Ang-2-Serumspiegel und hohem Ang-2-Serumspiegel.**

## 5. Diskussion

Das Angiopoietinsystem, bestehend aus Ang-1, Ang-2 und ihrem Rezeptor Tie-2, ist an der Regulation von Angiogenese beteiligt. Für verschiedene Tumorentitäten ist eine tumorendotheliale Überexpression und/oder de novo Expression von Ang-2 in Tumorzellen beschrieben worden. Diese konnte zum Teil mit klinischen und pathologischen Parametern korreliert werden. Ein erster Hinweis auf eine besondere Rolle von Ang-2 in NETs ergab sich aus Untersuchungen des mRNA Expressionsprofils in Pankreaskarzinomen mit exo- bzw. neuroendokriner Differenzierung, die eine erhöhte mRNA Expression von Ang-2 in pankreatischen NETs zeigten (Durkin et al. 2004). Diese Expressionsdaten legten eine Beteiligung des Angiopoietinsystems und insbesondere von Ang-2 für die Tumorneoangiogenese in NETs nahe und warfen die Frage auf, inwiefern auch die Menge des zirkulierenden Ang-2 in NET-Patienten gesteigert ist, ob Ang-2-Serumspiegel mit klinischen Parametern assoziiert sind und Serum-Ang-2-Spiegel sich als prognostischer Marker bei NET-Patienten eignen könnten.

In dieser Studie wurden mittels ELISA die Ang-2-Serumspiegel von 90 Patienten bestimmt und Daten einer Subgruppe von 42 Patienten auf Korrelation mit klinischen und pathologischen Parametern geprüft. Es konnte eine signifikant erhöhte Ang-2-Konzentration im Serum von NET-Patienten des GEP-Systems gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen und Angiopoietin-2 eine prognostische Relevanz zugeschrieben werden. Bei Abschluss der hier vorgelegten Arbeit erschien eine erste Analyse von Srirajaskanthan et al. (2009), in der Ang-2-Serumspiegel bei Patienten mit NETs bestimmt und ein bezüglich Patientenzahl und klinischen Daten recht gut vergleichbares Kollektiv untersucht wurde. Als wesentlicher Unterschied ist aber festzuhalten, dass in der Studie von Srirajaskanthan et al. (2009) der Indikator „Time to Progression“ und nicht die Überlebenswahrscheinlichkeit als Kriterium für die prognostische Wertigkeit von Ang-2 Verwendung fand. Insgesamt zeigen die Ergebnisse der beiden unabhängigen Untersuchungen jedoch fundierte Übereinstimmung und sichern auf diese Weise eine gute Reproduzierbarkeit der zentralen Befunde.

## 5.1. Erhöhung der Angiotensin-2-Serumspiegel in GEP-NETs

Mittels Immunoassay wurde bei 90 an GEP-NETs erkrankten Patienten eine signifikante Erhöhung des Serum-Ang-2-Spiegels gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen. Bereits zuvor konnte in der die Promotion betreuenden Arbeitsgruppe eine Ang-2-Expression mittels in situ Hybridisierung an Operationspräparaten von NET-Patienten gezeigt werden. Zusammen mit den aktuellen Befunden legen die Daten nahe, dass die Überexpression auch zu einer Erhöhung des Serumspiegels führt.

Die beschriebenen Ergebnisse der tumorspezifischen Überexpression decken sich mit der aktuellen Studienlage, in der für Tumoren unterschiedlicher Lokalisation wie Leber (Tanaka et al. 1999, Mitsunashi et al. 2003, Zhao et al. 2004, Zhong et al. 2006), Niere (Currie et al. 2002), Magen (Etoh et al. 2001, Wang et al. 2005), Mamma (Sfiligoi et al. 2003), Schilddrüse (Bunone et al. 1999), Haut (Brown et al. 2000), Ösophagus (Zhou et al. 2007), Gallengänge (Tang et al. 2006), Ovar (Hata et al. 2004), Kolon (Ahmad et al. 2001, Chung et al. 2006, Wang et al. 2007), Lunge (Takahama et al. 1999, Takanami 2004, Park et al. 2007), Prostata (Lind et al. 2005), Gehirn (Stratmann et al. 1998, Zagzag et al. 1999) und Blut (Watari et al. 2002) eine erhöhte Expression bzw. de novo Expression von Ang-2 beschrieben wurde. Hinsichtlich der Serumspiegelbestimmung von Ang-2 existieren aktuell für das HCC (Scholz et al. 2007), Plattenepithelkarzinom des Ösophagus (Zhou et al. 2007), NSCLC (Park et al. 2007), kolorektale Karzinom (Goede et al. 2010), Magenkarzinom (Jo et al. 2009), maligne Melanom (Helfrich et al. 2009) und die hämatologischen Malignome (Quartarone et al. 2006, Schliemann et al. 2007) dokumentierte Daten. Parallel zur hier vorgelegten Arbeit ist von Srirajaskanthan et al. (2009) erstmals zirkulierendes Ang-2 in GEP-NETs untersucht und als erhöht festgehalten worden.

Konträre Daten hinsichtlich einer tumorspezifischen Ang-2-Expression konnten letztendlich nur in einer Studie gefunden werden, die eine reduzierte Ang-2-Expression im Mammakarzinom gegenüber gesundem Gewebe nachwies (Currie et al. 2001). Abschließend ist sicherlich von Bedeutung, aus welchem zellulären Kompartiment das erhöhte Ang-2 in Tumoren stammt. Physiologisch ist die Expression von Ang-2 beschränkt auf Endothelzellen (Fiedler et al. 2004). Interessanterweise exprimieren nicht nur Endothel-, sondern auch Tumorzellen selbst Angiotensin-2. Dies konnte in der betreuenden Arbeitsgruppe mittels in situ Hybridisierung an NET-Schnitten gezeigt werden. Dabei fand sich Ang-2 mRNA nicht nur im Endothel, sondern auch in

Tumorzellen, allerdings in sehr variablem Umfang (10 untersuchte GEP-NET-Gewebe, in 6 > 75%, in 2 25-50%, in 2 5-25% Ang-2 mRNA Expression, Daten nicht gezeigt). Übereinstimmend sind vergleichbare Beobachtungen von weiteren Autoren für Tumore der Niere (Currie et al. 2002), des Magens (Etoh et al. 2001, Wang et al. 2005), der Mamma (Sfiligoi et al. 2003) und des Kolons (Chung et al. 2006) ebenfalls berichtet worden.

## **5.2. Angiotensin-2-Serumspiegel in Korrelation zum TNM-Stadium**

Klinisch wichtig ist es, Tumorerkrankungen in ihrem Verlauf vorhersagen zu können. Dieses stellt insbesondere bei heterogenen Entitäten wie den neuroendokrinen Tumoren ein Problem dar. Um Angiotensin-2 als möglichen prognostischen Marker etablieren zu können, wurden die Serum-Ang-2-Spiegel von 42 NET-Patienten im Zusammenhang mit Primärlokalisierung, Funktionalität und klinisch pathologischen Parametern betrachtet. Grundsätzlich ist in diesem Kontext eine eventuelle Inaktivierung von Angiotensin-2 durch seinen löslichen Rezeptor sTie-2 zu bedenken. Daher wurde ebenso der Serumspiegel des endogenen Inhibitors bestimmt (Daten nicht gezeigt). Eine Ang-2:sTie-2-Ratio änderte jedoch nicht die Korrelation zu klinischen und pathologischen Kenngrößen.

### **5.2.1. Angiotensin-2-Serumspiegel und T-Stadium**

Die Studienlage bezüglich anderer Tumorentitäten ist zu diesem Thema sehr variabel. Während für das HCC (Mitsubishi et al. 2003, Moon et al. 2003, Zhong et al. 2006), das Magenkarzinom (Sun et al. 2003, Wang et al. 2005, Moon et al. 2006) und für Schilddrüsentumoren (Bunone et al. 1999) ein positiver Zusammenhang zwischen Ang-2 und der Tumorgöße nachgewiesen werden konnte, wurde dies für das Mammakarzinom (Rmail et al. 2007) und das CCC (Tang et al. 2006) nicht bestätigt. Im Kolonkarzinom gibt es sowohl den Nachweis einer positiven (Wang et al. 2007) als auch negativen (Chung et al. 2006) Korrelation zwischen Ang-2 und dem T-Stadium. In dieser Arbeit zeigte das T4-Stadium höhere Ang-2-Werte, eine belastbare Beurteilung war jedoch auf Grund zu niedriger Fallzahlen nicht möglich. Des Weiteren zeigte sich interessanterweise auch keine Korrelation zwischen den Ang-2-Serumspiegeln und der Tumorgöße bei Patienten ohne Lebermetastasen (n=14, Daten nicht gezeigt). Das Niveau der Ang-2-Serumspiegel lag in dieser Untergruppe sogar im gleichen Bereich

wie das der gesunden Kontrollgruppe, selbst bei beachtlicher Tumorlast (bsp. 3x5cm, 6x12cm, 5x5cm Läsionen), was dafür sprechen würde, dass zirkulierendes Ang-2 in dieser Gruppe nicht die Tumorlast des Primarius reflektiert. Tierexperimentelle Untersuchungen der betreuenden Arbeitsgruppe unterstützen diese Beobachtung. So führte die Überexpression von Ang-2 in Xenografts der pankreatischen neuroendokrinen Zelllinie BON zwar zu einem erhöhten Ang-2-Serumspiegel und vermehrter lymphatischer Metastasierung, zeigte jedoch keine Unterschiede bezüglich Tumorwachstum, -größe oder -gewicht.

### **5.2.2. Angiopoietin-2-Serumspiegel und Lymphknotenmetastasierung/angioinvasion**

Bezüglich des N-Stadiums lassen die hier erhobenen Beobachtungen keine Schlussfolgerung zu, da nur bei vier der untersuchten Patienten kein Lymphknotenbefall vorlag. Allerdings konnte eine positive Assoziation bei anderen Tumorentitäten gezeigt werden, so für das Magenkarzinom (Wang et. al. 2005), Kolonkarzinom (Chung et al. 2006) und das NSCLC (Takanami 2004), während die Datenlage bei Tumoren der Mamma uneinheitlich ist (Sfiligoi et al. 2003, Rmail et al. 2007). Auch bezüglich des L-Stadiums zeigte sich kein Zusammenhang, wobei allerdings auch bei diesem Parameter die geringe Zahl der Patienten ohne Lymphangioinvasion keine sichere Beurteilung ermöglichte. Hier ist sicherlich die Analyse eines größeren Kollektivs zweckmäßig, um einen möglichen Zusammenhang von Ang-2 mit Lymphangioinvasion und lymphatischer Metastasierung für NETs abzuklären. Experimentell konnte das orthotope Xenograftmodell pankreatischer NETs den Zusammenhang zwischen Ang-2-Expression im Tumor und erhöhter Lymphknotenmetastasierung bereits funktionell belegen. Die Mechanismen, durch die Ang-2 lymphatische Metastasierung fördert, konnten jedoch noch nicht aufgezeigt werden. Bei gleicher Lymphgefäßdichte erscheint es möglich, dass die vermehrte Lymphknotenmetastasierung nicht ausschließlich auf der Bindung von Ang-2 an Tie2-Rezeptoren lymphendothelialer Zellen beruht. Vielmehr könnten beispielsweise auch Tie-2 unabhängige Effekte, etwa die Interaktion mit dem Fibronektinrezeptor  $\alpha 5\beta 1$  Integrin, eine Rolle spielen. Eine solche funktionelle Interaktion mit dem Fibronektinrezeptor wurde bereits für das Mammakarzinom nachgewiesen (Imanishi et al. 2007) und könnte auch in den

BON-Xenograft-Tumoren vorliegen, da BON-Zellen den Fibronectinrezeptor aufweisen (Fischer et al. 2005).

### **5.2.3. Angiopoietin-2-Serumspiegel und M-Stadium**

Eine eindeutig statistisch signifikante Korrelation konnte zwischen Serum-Ang-2 und der Metastasierung, speziell der Lebermetastasierung, festgestellt werden. Diese Beobachtung wurde in ähnlicher Weise im HCC (Zhong et al. 2006), für das Magenkarzinom (Wang et al. 2005), im Prostatakarzinom (Lind et al. 2005) und für das NSCLC (Park et al. 2007) bestätigt. Für NETs konnten korrespondierende Ergebnisse auch in der Arbeit von Srirajakanthan et al. (2009) gezeigt werden. Nachdem für NETs erhöhte Ang-2-Serumspiegel bei Vorliegen von Metastasierung somit in zwei unabhängigen Studien gesichert wurden, ist die Interpretation des Befundes jedoch kontrovers. Während die Arbeit von Srirajakanthan et al. (2009) die erhöhten Ang-2-Werte als Ausdruck der vergleichsweise größeren Tumormasse bei metastasierten Tumoren deutet, legen die tierexperimentellen Daten der betreuenden Arbeitsgruppe nahe, dass Ang-2 auch ursächlich am aggressiveren Phänotyp der metastasierenden Tumoren beteiligt ist. Vor diesem Hintergrund wäre eine exakte Quantifizierung der Tumorlast wünschenswert. Unglücklicherweise ist die quantitative Abschätzung der Tumorlast neuroendokriner Tumoren (insbesondere des extrahepatischen Tumorload) aktuell weder ein etabliertes Standardverfahren noch ist sie zuverlässig oder bewährt. Es gibt nur wenige Studien diesbezüglich (bspw. Rinke et al. 2009). Die SRS stellt in diesem Kontext kein quantitatives Verfahren dar. Aktuell wird in prospektiven klinischen Studien neben CT und MRT auch die PET-CT zur Visualisierung von neuroendokrinen Tumorerkrankungen geprüft. In der hier vorgelegten retrospektiven Studie war eine quantitative Bestimmung der Tumorlast nicht mehr zu ergänzen, da die Bildgebungsstandards sich im Beobachtungszeitraum von mehr als einer Dekade erheblich verändert haben. Allerdings liegen für die Subgruppe der resezierten Patienten ohne Lebermetastasierung akkurate Angaben zur Tumorlast des Primarius vor. Tatsächlich weisen diese Patienten selbst bei hoher Tumorlast keine erhöhten Ang-2-Serumspiegel im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe auf. Es besteht damit die Möglichkeit, dass stark Ang-2-produzierende Tumorzellen besonders aggressiv sind und so zu einer ausgedehnteren Metastasierung führen. Damit wäre ein hohes Ang-2-Expressionsniveau eines individuellen Tumors Ursache und nicht Folge

der Metastasierung. Für diese Hypothese sprechen tierexperimentelle Befunde, in denen die ektope Überexpression von Ang-2 in Tumorzellen zu einer verstärkten Metastasierung nach Xenotransplantation in Mausmodellen führte (Etoh et al. 2001). Auch die Ergebnisse der betreuenden Arbeitsgruppe an orthotopen NET-Xenograftmodellen unterstützen oben genannte Behauptung. Tiere mit Ang-2-exprimierenden Tumoren zeigten zwar keine Unterschiede in Tumorgröße, -wachstum oder -gewicht, jedoch im Trend mehr makroskopische Metastasen, insbesondere der Leber (25% vs. 8%), als Tiere der Kontrollgruppe. Allerdings gibt es auch hier gegensätzliche Beobachtungen bei Ang-2-Überexpression in Lungen- und Mammakarzinomzellen der Maus (Yu and Stamenkovic 2001). Letztendlich ist die Ursache dafür bis heute nicht eindeutig geklärt.

Abschließend stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage nach der Bedeutung der Leber im Rahmen möglicher Abbaumechanismen des Ang-2. In diesem Fall wäre ein Vergleich zwischen den Subgruppen „M1 mit Leberbeteiligung“ versus „M1 ohne Leberbeteiligung“ hochinteressant gewesen. Da die hämatogene hepatische Metastasierung jedoch einen der primären Metastasierungswege gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumoren darstellt, ergab sich kein repräsentatives Kollektiv für Patienten mit Fernmetastasen außerhalb der Leber. Eine potentielle Metabolisierung von Ang-2 in der Leber ist sicherlich denkbar, so dass erhöhte Ang-2-Serumspiegel erst bei Vorliegen von Leberfiliae aufträten. So werden beispielsweise endogene Amine neuroendokriner Tumoren in der Leber abgebaut und die Flushsymptomatik tritt erst bei hepatischer Metastasierung auf (Modlin et al. 2005). Da derzeit keine Daten zur Metabolisierung von Ang-2 vorliegen, bleiben diese Überlegungen jedoch rein spekulativ. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass in der Arbeitsgruppe des Betreuers deutlich erhöhte Ang-2-Serumspiegel bei Patienten mit exokrinen Pankreaskarzinomen beobachtet wurden, auch wenn keine Lebermetastasierung vorlag. Des Weiteren konnten Srirajakanthan et al. (2009) ebenfalls erhöhte Serum-Ang-2-Spiegel bei Patienten ohne Leberfiliae belegen.

### **5.3. Angiopoietin-2-Serumspiegel und andere Signalmoleküle**

Inzwischen ist gut etabliert, dass die biologische Wirkung von Ang-2 in hohem Maße kontextabhängig ist, wobei Ang-1 als alternativem Bindungspartner des Tie-2-Rezeptors, sTie2 als Inhibitor und VEGF jeweils besonders große Bedeutung

zugeschrieben werden. Einige Studien (Mitsuhashi et al. 2003, Zhong et al. 2006, Wang et al. 2007) untersuchten Ang-2 daher nicht isoliert, sondern in Verbindung mit Ang-1 (als Ang-2:Ang-1-Ratio) und VEGF. Leider stand für eine zusätzliche Bestimmung von Ang-1 und VEGF nicht in allen Fällen genügend Probenmaterial zur Verfügung. Zu Beginn der experimentellen Phase der Promotion war darüber hinaus auch kein kommerzieller ELISA für Ang-1 erhältlich. Aktuell liegen durch die Arbeit von Srirajaskanthan et al. (2009) inzwischen Daten zu Ang-1-Serumspiegeln bei neuroendokrinen Tumoren vor. Allerdings waren in dieser Untersuchung die Ang-1-Serumlevel bei NET-Patienten weder differierend zur Kontrollgruppe noch bestand eine Korrelation zwischen Ang-1 und der Prognose. Eine steigende Ang-2:Ang-1-Ratio war lediglich Folge des erhöhten Serum-Ang-2 und ermöglichte keine bessere prognostische Einschätzung als die Ang-2-Serumspiegel per se.

#### **5.4. Angiopoietin-2-Serumspiegel und Angioinvasion**

Ein unerwartetes Ergebnis ergab sich bei der Untersuchung der Ang-2-Serumspiegel bezüglich des V-Stadiums. Dabei zeigte der Median in der Gruppe ohne Angioinvasion einen höheren Wert als in der Gruppe mit Gefäßinfiltration. Dies ist eine interessante Beobachtung, da in zahlreichen Studien (Tanaka et al. 2002, Mitsuhashi et al. 2003, Wang et al. 2005, Chung et al. 2006, Zhong et al. 2006) hohe Angiopoietin-2-Expression mit vermehrter Angiogenese, Gefäßdichte und Angioinvasion assoziiert ist. Sicher ist es sinnvoll, diesen Befund in einem größeren Patientenkollektiv zu prüfen und dabei auch pankreatische gegenüber den intestinalen NETs separat zu betrachten. Erklärungsansätze für die aktuelle Befundlage sind spekulativ. Eine hypothetische Erläuterung könnte sich, zumindest bei den pankreatischen Tumoren, aus dem vorbeschriebenen hohen VEGF-Gehalt der gut differenzierten Tumore ergeben. Vorstellbar ist, dass die sehr permeablen „endokrinen“ Gefäße eine Angioinvasion in vergleichsweise wenig aggressiven Tumoren mit geringen Ang-2-Werten ermöglichen. Allerdings waren pankreatische NETs in beiden Gruppen (V0 und V1) nur knapp zur Hälfte vertreten, womit es fraglich erscheint, ob dieser Effekt sich in der Gesamtgruppe ebenso klar widerspiegeln würde. In diesem Kontext ist es allerdings auch bemerkenswert, dass in dem hier untersuchten Kollektiv der vermutete positive Zusammenhang zwischen Angiopoietin-2-Serumlevel und der Gefäßdichte nicht belegt werden konnte. 31 korrespondierende Serum- und Gewebeproben wiesen

diesbezüglich sogar eine inverse Korrelation auf ( $p=0,045$ ,  $r=-0,3634$ , Daten nicht gezeigt). In dieser Arbeit zeigte sich keine Assoziation zwischen Gefäßdichte und dem Patientenüberleben. Publierte Daten für NETs des Pankreas belegen sogar eine bessere Prognose bei erhöhter MVD (Marion-Audibert et al. 2003, Couvelard et al. 2005). Dieser Zusammenhang wird durch eine Studie von Takahashi et al. (2007) gestützt, in der die Gefäßarchitektur gut differenzierter NETs des Pankreas eher ruhend und ähnlich dem nicht transformierten endokrinen Gewebe war, während schlecht differenzierte Pankreas-NETs niedrige MVD mit jedoch irregulärer Tumorgefäßstruktur zeigten. Schlussendlich bleibt eine endgültige Erklärung offen, warum in NETs mit Tumoreinbruch in das Gefäßsystem niedrigere Ang-2-Serumspiegel zu dokumentieren sind. Die Gesamtheit der Betrachtungen legt dennoch den Schluss nahe, dass Ang-2 an Angiogenese und/oder Gefäßumbildung in NETs beteiligt ist.

## **5.5. Angiopoietin-2-Serumspiegel und Grading**

Bezüglich der histologischen Einteilung der inhomogenen neuroendokrinen Tumoren wurde aktuell von Rindi et al. (2006 und 2007) vorgeschlagen, eine Gruppierung in Abhängigkeit vom Ki-67-Proliferationsindex in G1 (Ki-67 < 2%), G2 (Ki-67 3-20%) und G3 (Ki-67 > 20%) zur besseren Transparenz und Vergleichbarkeit vorzunehmen. Ki-67 als prädikativer Wert für die Malignität neuroendokriner Tumoren ist in zahlreichen Studien beschrieben worden (De Manzoni et al. 1998, Rindi et al. 1999, Kettenbach et al. 2003, Pape et al. 2004, Plöckinger et al. 2004). Es stellte sich die Frage, ob es einen positiven Zusammenhang zwischen Ang-2 und der histologischen Differenzierung gibt, wie er zum Beispiel im HCC (Wada et al. 2006), Prostatakarzinom (Lind et al. 2005) und in hämatologischen Tumoren (Oka et al. 2005) beschrieben worden ist.

In dieser Arbeit konnten statistisch signifikant erhöhte Ang-2-Serumspiegel bei Patienten mit G3-NETs belegt werden. Dies deckt sich mit Ergebnissen der Studie von Srirajakanthan et al. (2009). Da Chromogranin A Ausdruck einer differenzierten Zellfunktion ist und daher von schlecht differenziertem Gewebe erfahrungsgemäß nur minimal produziert wird, besteht in der oben genannten Subgruppe eine eingeschränkte Aussagekraft durch Chromogranin A. In diesem Kontext wäre somit ein Vorteil von Ang-2 gegenüber CgA im Tumor Follow-up denkbar. Auch hier sollte darauf hingewiesen werden, dass es Studien gibt, die keinen oben genannten Zusammenhang beschreiben. So korreliert Ang-2 für das HCC bei Zhong et al. (2006) ebenso wenig mit

dem histologischen Grad wie in Karzinomen des Magens (Nakayama et al. 2004), der Mamma (Rmail et al. 2007), im CCC (Tang et al. 2006) und bei der AML (Loges et al. 2005, Schliemann et al. 2007).

In diesem Kontext sei erwähnt, dass über die Regulation der Ang-2-Expression in Tumorzellen aktuell sehr wenig bekannt ist. Arbeiten an Endothelzellen haben im Gegensatz dazu PMA, Thrombin und Histamin als Stimulanz für Ang-2-Expression identifiziert (Fiedler et al. 2004). Ebenso liegen nur für diese Zellpopulation Untersuchungen zur Ang-2-Promotor-Regulation vor (Hegen et al. 2004).

## **5.6. Angiopietin-2-Serumspiegel und CgA-Spiegel**

Chromogranin A ist aktuell der präziseste und verlässlichste Serum-Tumormarker für alle funktionell aktiven und inaktiven neuroendokrinen Tumoren (Ferrari et al. 1999) mit einer Sensitivität von 67.9% und einer Spezifität bei 85.7% (Bajetta et al. 1999). Es bestehen jedoch nur wenige Daten zu seiner prognostischen Aussagekraft. In vier Arbeiten (Drivsholm et al. 1999, Taupenot et al. 2003, Ranno et al. 2006, Gregorc et al. 2007) wurde eine Korrelation zwischen erhöhtem CgA und schlechterer Prognose beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, beide Serumproteine miteinander zu korrelieren. Es konnte gezeigt werden, dass bei NET-Patienten Ang-2-Serumspiegel statistisch signifikant mit den CgA-Spiegeln korrelieren. Der Korrelationskoeffizient ist mit 0,4370 jedoch relativ niedrig. Das mag einerseits daran liegen, dass Ang-2 sowohl physiologisch und tumorassoziiert im Endothel, andererseits jedoch auch von Tumorzellen exprimiert wird. Weiterhin deuten die aktuell erhobenen Befunde darauf hin, dass individuelle Tumoren unterschiedlich viel Ang-2 produzieren, wobei, wie bereits diskutiert, keine Daten zur Regulation der Ang-2-Expression in Tumorzellen veröffentlicht sind. Da, wie schon erwähnt, Ang-2-Überexpression im Vergleich mit anderen Tumoren nicht NET spezifisch ist sowie auf Grund der anderen oben beschriebenen Überlegungen erscheint Serum-Ang-2 als NET-Tumormarker im Vergleich mit CgA grundlegend nicht geeignet. Allerdings zeichnet sich zirkulierendes Ang-2 als prognostischer Parameter aus, während CgA seinen Stellenwert eher in der individuellen Verlaufskontrolle hat. Dies könnte sich insbesondere in der Gruppe der Grad-2-Tumoren als außerordentlich hilfreich erweisen, da diese häufig einen hochvariablen Spontanverlauf zeigen, so dass die Entscheidungsfindung zwischen

Beobachtung und Therapie selbst erfahrenen Klinikern häufig schwer fällt. Gerade in dieser Situation fehlen bisher klinisch einfach bestimmbare Biomarker.

### **5.7. Angiopoietin-2-Serumspiegel und Überlebenszeitanalyse**

Am Ende dieser Arbeit wurden die Ang-2-Serumspiegel im Hinblick auf die Überlebenszeit der NET-Patienten und somit deren prognostische Relevanz überprüft. Die Patienten wurden abhängig von der Höhe ihres Ang-2-Serumspiegels in eine Gruppe mit niedrigem oder durchschnittlichem medianen Ang-2-Wert (< 75%-Perzentile) und eine Gruppe mit hohem Ang-2-Wert ( $\geq$  75%-Perzentile) aufgeteilt. Die mediane Überlebenszeit der Patienten mit hohem Ang-2-Serumspiegel betrug 13 Monate, in der Gruppe mit niedrigem oder durchschnittlichem Serum-Ang-2-Spiegel wurde dieser Wert noch nicht erreicht. Dieses Ergebnis belegt, dass der Ang-2-Serumspiegel einen geeigneten Parameter darstellt, um eine prognostische Einschätzung bei NET-Patienten des GEP-Systems zu treffen. Im Gegensatz dazu war die An-/Abwesenheit von Metastasen nicht mit der Patientenüberlebenszeit assoziiert, was den Stellenwert der Messung von zirkulierendem Ang-2 unterstreicht. Übereinstimmend mit den erhobenen Daten ist auch für andere Tumorentitäten eine prognostische Relevanz von Ang-2 beschrieben. Sowohl im HCC (Mitsuhashi et al. 2003, Wada et al. 2006), Prostatakarzinom (Lind et al. 2005) und Mammakarzinom (Schliemann et al. 2007) als auch in Tumoren des Magens (Etoh et al. 2001), Ovars (Hata et al. 2004), Kolons (Chung et al. 2006), der Lunge (Takahama et al. 1999, Tanaka et al. 2002) und des hämatopoetischen Systems (Oka et al. 2005) zeigte sich bei erhöhter zellulärer Ang-2-Expression eine schlechtere Prognose. Es gibt, wie bereits in der Einleitung erwähnt, auch Literatur, die diesen Zusammenhang nicht oder sogar entgegengesetzt beschreibt, jedoch in weitaus geringerer Zahl (Schliemann et al. 2006, Tang et al. 2006, Wada et al. 2006, Rmail et al. 2007). Bis jetzt wurde jedoch nur in wenigen Studien, außer dieser, der Angiopoietin-2-Serumspiegel als Prognosefaktor identifiziert (Schliemann et al. 2007, Srirajaskanthan et al. 2009, Jo et al. 2009, Helfrich et al. 2009, Goede et al. 2010). Offenbar gibt es auch Situationen, in denen die prognostische Bedeutung erhöhter Ang-2-Mengen in unterschiedlichen Kompartimenten voneinander abweicht, wie Schliemann sehr anschaulich in zwei Berichten bezüglich der akuten myeloischen Leukämie darlegen konnte. Während zelluläre Ang-2-Überexpression im Knochenmark

als Prädiktor für eine bessere Prognose angesehen wurde (Schliemann et al. 2006), korrelierte ein erhöhter Ang-2-Serumspiegel mit einer kürzeren Überlebensdauer (Schliemann et al. 2007). Als mögliche Ursache wird diskutiert, dass die erhöhten Serumspiegel ihren Ursprung nicht in den AML-Zellen, sondern in einem anderen Zellkompartiment haben. Außerdem ist unklar, inwieweit die unterschiedlichen Methoden (Serumlevel versus Zelllevel des Ang-2, bestimmt mit Immunhistochemie, RT-PCR oder ISH) direkt vergleichbare Daten liefern.

## **5.8. Angiopoietin-2-Serumspiegel - ein Ausblick**

Insgesamt wurde in dieser Arbeit erstmalig in GEP-NETs Angiopoietin-2 als geeigneter prognostischer Parameter identifiziert und erhöhte Ang-2-Serumspiegel bei Patienten mit neuroendokrinen Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems nachgewiesen. Im Hinblick auf Metastasierung, im Speziellen der Leber, Grading und Überlebenszeit zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zur Höhe des Serum-Ang-2-Spiegels. Diese Ergebnisse werfen interessante grundlagenwissenschaftliche Fragen nach der Regulation der Ang-2-Expression in neuroendokrinen Tumorzellen/-endothelien und den tumorbiologischen Effekten speziell im NET-Kontext auf. Diese Aspekte konnten teilweise parallel im betreuenden Labor an PET-Gewebeschnitten, NET-Zelllinien und orthotopen NET-Xenograftmausmodellen bearbeitet werden. Während sich in der in situ Hybridisierung Ang-2 mRNA in Endothel- und NET-Zellen, nicht jedoch im nichttransformierten Pankreas zeigte, konnte Tie-2 mittels Immunhistochemie eindeutig im Endothel, allerdings nicht im Epithel neuroendokriner Tumoren identifiziert werden. Die Anwesenheit von Ang-2 und seines Rezeptors Tie-2 in NET lässt so auf eine auto- oder parakrine Funktion des angioregulatorischen Wachstumsfaktors in neuroendokrinen Tumoren schließen. In vitro Wachstum von BON-Zellen mit experimenteller de novo Expression von Ang-2 (Ang-2-transfected versus Mock-transfected) unterschieden sich weder in Proliferation noch Apoptose. In vivo führte eine Überexpression von Ang-2 in BON orthotopen Xenografts zu erhöhten Ang-2-Serumspiegeln, gesteigerter MVD und vermehrter Metastasierung ohne nachweisbaren Einfluss auf Tumorwachstum, -größe, -gewicht oder LVD. Zusammenfassend stellt damit die Induktion von Angiopoietin-2 in neuroendokrinen Neoplasien einen klinisch relevanten Pathomechanismus der Tumorprogression und einen Prognosefaktor zur Vorhersage ungünstiger Verläufe dar.

Daneben ergeben sich weitere bedeutsame Aspekte:

1.) Die vorliegenden Daten erlauben die Planung einer größeren Untersuchung an mehr Patienten, unter Umständen auch in einem prospektiven Studiendesign. Anhand der dann zu erhebenden Daten könnten mittels uni- und multivariater Analyse die aktuellen Beobachtungen geprüft bzw. bestätigt werden. Darüber hinaus könnten mehrfache Bestimmungen im Zeitverlauf Aufschluss geben, inwiefern Ang-2 durch Behandlungsmodalitäten wie beispielsweise Chemotherapie, SRS-Analoga oder chirurgische Therapie reguliert wird. Ebenfalls wäre damit ein Vergleich mit anderen unabhängigen Prognosefaktoren möglich. Für die Gruppe der pankreatischen NETs wäre es sicherlich auch hochinteressant zu bestimmen, ob die beiden neuerlich zugelassenen Substanzen Everolimus und Sunitinib (Yao et al. 2011, Raymond et al. 2011), deren Wirkmechanismen antiangiogene Effekte umfassen, Ang-2-Serumspiegel beeinflussen können.

2.) Die im Vergleich zur Biopsieentnahme methodisch relativ einfache Bestimmung des Serumspiegels erlaubt die Einteilung von NET-Patienten in zwei Gruppen mit deutlich unterschiedlichem Risiko. Patienten mit hohem Serum-Ang-2 könnten möglicherweise von engmaschigeren klinischen Kontrollen bzgl. Rezidiv und Metastasierung profitieren. Weiterhin könnten stark erhöhte Ang-2-Serumspiegel bei schwierigen Therapieentscheidungen berücksichtigt werden, insbesondere als Ergänzung oder Alternative zu Chromogranin A und bei G2-Tumoren.

3.) Bei Patienten mit hohen Serum-Ang-2-Spiegeln könnte Angiotensin-2 nicht nur als Biomarker, sondern auch als therapeutisches Target Verwendung finden. Ang-2 spezifische Behandlungsansätze befinden sich zurzeit in der klinischen Entwicklung (Oliner et al. 2004), wie beispielsweise das Ang-2 spezifische RNA Aptamer (Sarraf-Yazdi et al. 2007) und der selektive Angiotensin Inhibitor AMG 386 (Herbst et al. 2009). Ebenfalls denkbar wäre, dass Patienten mit hohen versus niedrigen Serum-Ang-2-Werten sich hinsichtlich der Wirksamkeit antiangiogener Therapien unterscheiden, die primär gegen VEGF gerichtet sind. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde auf die funktionelle Interaktion von Ang-2 und VEGF hingewiesen (Holash et al. 1999). Damit dürfte eine Inhibition von z. B. VEGF über monoklonale Antikörper (Lien et Lowman 2008) oder über VEGFR spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren (Schenone et al. 2007) eventuell auch biologische Effekte von Ang-2 modulieren.

## 6. Zusammenfassung

Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumoren stellen eine heterogene Tumorentität mit unterschiedlichen klinischen Verläufen dar. Das sezernierte Protein Angiopoietin-2 ist an der Regulation von Tumor assoziierter Angiogenese beteiligt. Für viele Tumorentitäten ist die Überexpression und/oder eine de novo Expression beschrieben, die Situation in NETs ist bislang nur unzureichend charakterisiert.

In dieser Arbeit wurden von 90 GEP-NET-Patienten mittels ELISA die Ang-2-Serumspiegel bestimmt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Ang-2 im Serum statistisch hoch signifikant erhöht gegenüber Seren gesunder Probanden vorliegt ( $p < 0,001$ ). Bei 42 der Patienten konnten die Ang-2-Serumspiegel darüber hinaus mit klinischen und pathologischen Parametern korreliert werden. Keine Korrelation zeigte sich im Hinblick auf Primärlokalisierung, Funktionalität/Nonfunktionalität, Primärtumorgröße, Lymphknotenmetastasierung und Lymphgefäßinvasion. Patienten mit Metastasen, speziell mit Lebermetastasen, hatten statistisch hoch signifikant höhere Ang-2-Serumspiegel ( $p = 0,0005$  und  $p = 0,0012$ ). Weiterhin zeigte sich eine Erhöhung von zirkulierendem Ang-2 in schlecht differenzierten G3-Tumoren gegenüber G1- und G2-Tumoren (G3 vs. G1/G2  $p = 0,018$ ). Serum-Ang-2-Spiegel korrelierten schwach, aber signifikant mit dem Serum-Tumormarker Chromogranin A ( $r = 0,4370$ ,  $p = 0,0043$ ). Schließlich hatten Patienten mit niedrigen oder durchschnittlichen Serum-Ang-2-Werten ( $< 75\%$ -Perzentile) eine signifikant verlängerte Überlebenszeit (n. d. versus 13 Monate,  $p = 0,0006$ , HR=0,05801, 95%-KI 0,01148–0,2930).

Die hier erhobenen Befunde werden von weiteren Resultaten der betreuenden Arbeitsgruppe zur Ang-2-Expression in NET-Patientenproben und der Funktion von Ang-2 in NET-Xenografts in vivo flankiert, welche die de novo Expression von Ang-2 in neuroendokrinen Tumoren und eine funktionelle Rolle von Ang-2 für lymphogene Metastasierung belegen.

Insgesamt dokumentieren die hier an NETs erbrachten Daten einen überzeugenden Zusammenhang zwischen Krankheitsprozess und Ang-2, wobei die Ergebnisse nahe legen, dass Ang-2 ursächlich an einem aggressiveren Krankheitsverlauf beteiligt ist. Besondere Bedeutung für die Translation in die Klinik hat die Beobachtung, dass ein stark erhöhter Ang-2-Serumspiegel erstmalig als prognostischer Parameter bezüglich des Überlebens von GEP-NET-Patienten etabliert werden konnte.

## 7. Literaturverzeichnis

Ahmad SA, W Liu, YD Jung, F Fan, N Reinmuth, CD Bucana, LM Ellis. 2001. Differential expression of angiopoietin-2 in colon carcinoma. *Cancer*. 92(5):1138-1143.

Ahmad SA, W Liu, YD Jung, F Fan, M Wilson, N Reinmuth, RM Shaheen, CD Bucana, LM Ellis. 2001. The effect of angiopoietin-1 and -2 on tumor growth and angiogenesis in human colon cancer. *Cancer Res*. 61(4):1255-1259.

Algire GH and HW Chalkley. 1945. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst. USA*. 6:73-85.

Arnold R and M Frank. 1996. Gastrointestinal endocrine tumors: medical management. *Baillieres Clin Gastroenterol*. 10(4):737-759. Review.

Arnold R, ME Trautmann, W Creutzfeldt, R Benning, M Benning, C Neuhaus, R Jurgensen, K Stein, H Schafer, C Bruns, HJ Dennler. 1996. Somatostatin analogue octreotide and inhibition of tumour growth in metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumors. *Gut*. 38(3):430-438.

Augustin HG, GY Koh, G Thurston and K Alitalo. 2009. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10(3):165-177. Review.

Bach F, FJ Uddin, D Burke. 2007. Angiopoietins in malignancy. *EJSO*. 33(1):7-15. Review.

Bajetta E et al. 1999. *Cancer* September 1. Volume 86. Number 5.

Baluk P, H Hashizume, DM McDonald. 2005. Cellular abnormalities of blood vessels as target in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 15(1):102-111. Review.

Bechstein W and P Neuhaus. 1994. Liver transplantation of hepatic metastases of neuroendocrine tumors of the lung, pancreas and gut. *Virchows Arch*. 425:547-560.

Bernini GP, A Moretti, AG Bonadio, M Menicagli, P Viacava, AG Naccarato, P Iacconi, P Miccoli, A Salvetti. 2002. Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab*. 87(11):4961-4965.

Brown LF, BJ Dezube, K Tognazzi, HF Dvorak, GD Yancopoulos. 2000. Expression of Tie1, Tie2 and angiopoietin 1, 2 and 4 in Kaposi's sarcoma and cutaneous angiosarcoma. *Am J Pathol*. 156(6):2179-2183.

Bunone G, P Vigneri, L Mariani, S Buto, P Collini, S Pilotti, MA Pierotti, I Bongarzone. 1999. Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. *Am J Pathol*. 155(6):1967-1976.

Buscail L, N Delesque, J Esteve et al. 1994. Stimulation of tyrosine phosphatase and inhibition of cell proliferation by somatostatin analogues: mediation by human somatostatin receptor subtypes SSTR1 and SSTR2. *Proc Nat Acad Sci. USA.* 91(6):2315-2319.

Caine GJ, P Ryan, GYH Lip, AD Blann. 2007. Significant decrease in angiopoietin-1 and angiopoietin-2 after radical prostatectomy in prostate cancer patients. *Cancer Lett.* Jun 28. 251(2):296-301.

Capella C , PU Heitz, H Höfler , E Solcia, G Klöppel. 1995. Revised classification of neuroendocrine tumors of the lung, pancreas and gut. *Virchows Arch.* 425(6):547-560. Review.

Carmeliet P. 1999. Controlling the cellular brakes. *Nature.* 401:657-658.

Carmeliet P. 2000. Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 6(4):389-395. Review.

Carmeliet P and RK Jain. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 407(6801):249-257. Review.

Chin KF, J Greenman, R Reusch, E Gardiner, D Marme and JRT Monson. 2003. Vascular endothelial growth factor and soluble Tie-2 receptor in colorectal cancer: associations with disease recurrence. *EJSO.* 29(6):497-505.

Chung YC, YC Hou, CN Chang, TH Hseu. 2006. Expression and prognostic significance of angiopoietin in colorectal carcinoma. *J Surg Oncol.* Dec 1. 94(7):631-638.

Couvelard A, D O'Toole, H Turley, R Leek, A Sauvanet, C Degott, P Ruzniewski, J Belghiti, AL Harris, K Gatter and F Pezzella. 2005. Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumour progression. *Br J Cancer.* 92(1):94-101.

Creutzfeldt W, HH Bartsch, U Jacobaschke. 1991. Treatment of gastrointestinal endocrine tumors with interferons-alpha and octreotide. *Acta Oncol.* 30(4):529-535.

Currie MJ, SP Gunningham, C Han, PAE Scott, BA Robinson, AL Harris, SB Fox. 2001. Angiopoietin-1 is inversely Related to Thymidine Phosphorylase Expression in Human Breast Cancer. Indicating a Role in Vascular Remodeling. *Clin Cancer Res.* 7(4):918-927.

Currie MJ, SP Gunningham, K Turner et al. 2002. Expression of the angiopoietins and their receptor Tie2 in human renal clear cell carcinomas: regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia. *J Pathol.* 198(4):502-510.

- Davis S, TH Aldrich, PF Jones, A Acheson, DL Compton, V Jain, TE Ryan, J Bruno, C Radziejewski, PC Maisonpierre and GD Yancopoulos. 1996. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, by secretion trap expression cloning. *Cell*. 87(7):1161-1169.
- De Manzoni G, G Verlato, A Tomezzoli, A Guglielmi, G Pelosi, F Ricci, A Di Leo, C Cordiano. 1998. Study on Ki-67 immunoreactivity as a prognostic indicator in patients with advanced gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 28(9):534-537.
- Detjen KM, S Rieke, A Deters, P Schulz, A Rexin, S Vollmer, P Hauff, B Wiedenmann, M Pavel and A Scholz. 2010. Angiopoietin-2 promotes disease progression of neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res*. 16(2):420-429.
- Di Bartolomeo M, E Bajetta, R Buzzoni, L Mariani, C Carnaghi, L Somma, N Zilembo, A Di Leo. 1996. Clinical efficacy of octreotide in the treatment of metastatic neuroendocrine tumors. *Cancer*. 77(2):402-408.
- Drivsholm L, LI Paloheimo, K Osterlin. 1999. Chromogranin A, a significant prognostic factor in small cell lung cancer. *Br J Cancer*. Oct. 81(4):667-671.
- Dumont DJ, GJ Gradwohl, GH Fong, R Auerbach, ML Breitman. 1993. The endothelial-specific receptor tyrosine kinase tek is a member of a new subfamily of receptors. *Oncogene*. 8(5):1293-1301.
- Durkin AJ, M Bloomston, TJ Yeatman et al. 2004. Differential expression of Tie2 receptor and its ligands in human pancreatic tumors. 199(5):724-731.
- Eggert A, N Ikegami, J Kwiatkowski, H Zhao, GM Brodeur, BP Himelstein. 2000. High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas. *Clin Cancer Res*. 6(5):1900-1908.
- Eriksson B, J Renstrup, H Iman, K Öberg. 1997. High-dose treatment with lanreotide of patients with advanced neuroendocrine gastrointestinal tumors: Clinical and biological effects. *Ann Oncol*. 8(10):1041-1044.
- Eriksson B, K Ödberg and M Stridsberg. 2000. Tumormarkers in neuroendocrine tumours. *Digestion* 62 (Suppl 1):33-38.
- Etoh T, H Inoue, S Tanaka, GF Barnard, S Kitano, M Mori. 2001. Angiopoietin-2 is related to tumour angiogenesis in gastric carcinoma: possible in vivo regulation via induction of proteases. *Cancer Res*. 61(5):2145-2153.
- Faiss S, UF Pape, M Böhmig, Y Dörffel, U Mansmann, W Goldner, EO Riecken, B Wiedenmann. 2003. Prospective, randomized, multicenter trial on the antiproliferative effect of lanreotide, interferon alpha and their combination for therapy of metastatic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors – The International Lanreotide and interferon Alpha Study Group. *J Clin Oncol*. 21(14):2689-2696.

Ferrari L, E Seregini, E Bajetta, A Martinetti, E Bombardieri. 1999. The biological characteristics of chromogranin A and its role as a circulating marker in neuroendocrine tumours. *Anticancer Res.* 19(4c):3415-3428. Review.

Fiedler U, M Scharpfenecker, S Koidl, A Hegen, V Grunow, JM Schmidt, W Kritz, G Thurston, HG Augustin. 2004. The Tie-2 ligand Angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood.* 103(11):4150-4156.

Fischer C, H Sanchez-Ruderisch, M Welze, B Wiedenmann, T Sakai, S André, HJ Gabius, L Khachigian, KM Detjen, S Rosewicz. 2005. Galectin-1 interacts with the  $\alpha 5\beta 1$  fibronectin receptor to restrict carcinoma cell growth via induction of p21 and p27. *J Biol Chem.* 280(44):37266-37277.

Folkman J. 1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 82(1):4-6.

Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular and other diseases. *Nature Med.* 1(1):27-31. Review.

Gale N, G Thurston, S Hackett. 2002. Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by angiopoietin-1. *Dev Cell.* 3(3):411-423.

Gale NW, GD Yancopoulos. 1999. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev.* 13(9):1055-1066. Review.

Gamble JR, J Drew, L Trezise, A Underwood, M Parson, L Kasminkas, J Rudge, G Yancopoulos, MA Vadas. 2000. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circ Res.* 87(7):603-607.

Goede V, O Coutelle, J Neuneier, A Reinacher-Schick, R Schnell, TC Koslowsky, MR Weihrauch, B Cremer, H Kashkar, M Odenthal, HG Augustin, W Schmiegel, M Hallek, UT Hacker. 2010. Identification of serum angiopoietin-2 as a biomarker for clinical outcome of colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing therapy. *Br J Cancer.* 103(9):1407-1414.

Goldman E. 1907. The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. *Lancet.* 2:1236-1240.

Gregorc V, A Spreafico, I Floriani, B Colombo, V Ludovini, L Pistola, G Bellezza, MG Viganò, E Villa, A Corti. 2007. Prognostic value of circulating chromogranin A and soluble tumor necrosis factor receptors in advanced non small cell lung cancer. *Cancer.* 110(4):845-853.

Haralabopoulos GC, DS Grant, HK Kleinman, ME Maragoudakis. 1997. Thrombin promotes endothelial cells alignment in matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. *Am J Physiol.* 273:239-245.

- Hata K, K Nakayama, R Fujiwaki, H Katabuchi, H Okamura, K Miyazaki. 2004. Expression of the angiopoietin-1, angiopoietin-2, Tie2, and vascular endothelial growth factor gene in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 93(1):215-222.
- Hayes AJ, WQ Huang, J Mallah, D Yang, ME Lippman, LY Li. 1999. Angiopoietin-1 and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc Res.* 58(3):224-237.
- Hegen A, S Koidl, K Weindel, D Marmé, HG Augustin, U Fiedler. 2004. Expression of angiopoietin-2 in endothelial cells is controlled by positive and negative regulatory promoter elements. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(10):1803-1809.
- Helfrich I, L Edler, A Sucker, M Thomas, S Christian, D Schadendorf, HG Augustin. 2009. Angiopoietin-2 levels are associated with disease progression in metastatic malignant melanoma. *Clin Cancer Res.* 15(4):1384-1392.
- Herbst RS, D Hong, L Chap, R Kurzrock, E Jackson, JM Silverman, E Rasmussen, YN Sun, D Zhong, YC Hwang, JL Evelhoch, JD Oliner, N Le and LS Rosen. 2009. Safety, pharmacokinetics, and antitumor activity of AMG 386, a selective angiopoietin inhibitor, in adult patients with advanced solid tumor. *J Clin Oncol.* 27(21):3557-3565.
- Holash J, SJ Wiegand, GD Yancopoulos. 1999. New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene.* 18(38):5356-5362. Review.
- Huang YQ, JJ Li, L Hu, M Lee, S Karpatkin. 2002. Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells. *Blood.* 99(5):1646-1650.
- Ide AG, NH Baker and SL Warren. 1939. Vascularization of the Brown Pearce rabbit epithelioma transplant as seen in the transparent ear chamber. *Am J Radiol.* 42:891-899.
- Imanishi Y, B Hu, MJ Jarzynka, P Guo, E Elishaev, I Bar-Joseph and SY Cheng. 2007. Angiopoietin-2 stimulates breast cancer metastasis through the  $\alpha 5\beta 1$  integrin-mediated pathway. *Cancer Res.* 67(9):4254-4263.
- Janson ET, L Holmberg, M Stridsberg, B Eriksson, E Theodorsson, E Wilander, K Öberg. 1997. Carcinoid tumors: analysis of prognostic factors and survival in 301 patients from a referral center. *Ann Oncol.* 8(7):685-690.
- Jensen RT. 2000. Carcinoid and pancreatic endocrine tumors: recent advances in molecular pathogenesis, localization and treatment. *Curr Opin Oncol.* 12(4):368-377. Review.
- Jo MJ, JH Lee, BH Nam, MC Kook, KW Ryu, IJ Choi, YW Kim, JM Bae. 2009. Preoperative serum angiopoietin-2 levels correlate with lymph node status in patients with early gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 16(7):2052-2057.

Jones N, Z Master, J Jones, D Bouchard, Y Gunji, H Sasaki, R Daly, K Alitalo and DJ Dumont. 1999. Identification of Tek/Tie2 binding partners. Binding to a multifunctional docking site mediates cell survival and migration. *J Biol Chem.* 274(43):30896-30905.

Jones N, SH Chen, C Sturk, Z Master, J Tran, RS Kerbel and DJ Dumont. 2003. A Unique Autophosphorylation Site on Tie2/Tek Mediates Dok-R Phosphotyrosine Binding Domain Binding and Function. *Mol Cell Biol.* 23(8):2658-2668.

Kawahara M, H Kammori, H Kanauchi, C Noguchi, S Kuramoto, M Kaminishi, H Endo, K Takubo. 2002. Immunohistochemical prognostic indicators of gastrointestinal carcinoid tumors. *Eur J Surg Oncol.* 28(2):140-146.

Kettenbach J, SL Müller, M Schindl. 2003. Interventionelle Therapie von neuroendokrinen Tumoren des gastrointestinalen Traktes. *Wien Klin Wochenschr.* 115 (Suppl 2):56-64. Review.

Kim I, JH Kim, SO Moon, HJ Kwak, NG Kim and GY Koh. 2000. Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene.* 19(39):4549-4552.

Kim I, HG Kim, SO Moon, SW Chae, JN So, KN Koh, BC Ahn, GY Koh. 2000. Angiopoietin-1 induces endothelial cell sprouting through the activation of focal adhesion kinase and plasmin secretion. *Circ Res.* 86(9):952-959.

Klöppel G, PU Heitz, C Capella, E Solcia. 1996. Pathology and nomenclature of human gastrointestinal neuroendocrine (carcinoid) tumors and related lesions. *World J Surg.* 20(2):132-141. Review.

Klöppel G, A Perren und PU Heitz. 2003. Vom Karzinoid zum neuroendokrinen Tumor: Klassifikation im Magen-Darm-Trakt und Pankreas. *Dtsch. Ärztebl.* 100:A1932-1942. Heft 28-29.

Kontos CD, TP Stauffer, WP Yang, JD York, L Huang, MA Blonar, T Meyer and KG Peters. 1998. Tyrosine 1101 of Tie2 is the major site of association of p85 and is required for activation of phosphatidylinositol-3-kinase and Akt. *Mol Cell Biol.* 18(7):4131-4140.

Korhonen J, A Polvi, J Partanen, K Alitalo. 1994. The mouse tie receptor tyrosine kinase gene: expression during embryonic angiogenesis. *Oncogene.* 9(2):395-403.

Krenning EP, DJ Kwekkeboom, WH Bakker, WA Breeman, PP Kooij, HY Oei, M Van Hagen, PT Postema, M De Jong and JC Reubi. 1993. Somatostatin receptor scintigraphy with (111In-DTPA-D-Phe1)- and (123I-Tyr3)-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients. *Eur J Nucl Med.* 20(8):716-731. Review.

Kulke MH. 2003. Neuroendocrine tumours: clinical presentation and management of localized disease. *Cancer Treat Rev.* 29(5):363-370. Review.

Kwak HJ, JN So, SJ Lee et al. 1999. Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Lett.* 448:249-253.

Lang H, KJ Oldhafer, A Weimann et al. 1997. Liver transplantation for metastatic neuroendocrine tumors. *Ann Surg.* Apr. 225(4):347-354. Review.

Lien S, HB Lowman. 2008. Therapeutic anti-VEGF antibodies. *Handb Exp Pharmacol.* (181):131-150. Review.

Lind AJ, P Wikstrom, T Granfors, L Egevad, P Stattin, A Bergh. 2005. Angiopoietin 2 expression is related to histological grade, vascular density, metastases and outcome in prostate cancer. *Prostate.* 62(4):394-399.

Loges S, G Heil, M Bruweleit, V Schroder, M Brutzal, U Fischer et al. 2005. Analysis of concerted expression of angiogenic growth factors in acute myeloid leukaemia: expression of angiopoietin-2 represents an independent prognostic factor for overall survival. *J Clin Oncol.* 23(6):1109-1171.

Maisonpierre PC, C Suri, PF Jones, S Bartunkova, SJ Wiegand, C Radziejewski, D Compton, J McClain, TH Aldrich, N Papadopoulos, TJ Daly, S Davis, TN Sato and GD Yancopoulos. 1997. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in-vivo angiogenesis. *Science.* 277(5322):55-60.

Marc D. 1993. Biology and management of the midgut carcinoid. *Am J Surg.* 165:288-297.

Marion-Audibert AM, C Barel, G Gouysse, J Dumortier, F Pilleul, C Pourreyron, V Hervieu, G Poncet, C Lombard-Bohas, JA Chayvialle, C Partensky, JY Scoazec. 2003. Low microvessel density is an unfavorable histoprognostic factor in pancreatic endocrine tumors. *Gastroenterology.* 125(4):1094-1104.

Marmé D. 2005. Antiangiogenese. Ein therapeutisches Prinzip in der Krebsbehandlung. Hemmung der Tumorangioenese. *InFo. Onkologie Beilage. CME Spezial.* 1:3-15.

Mitsubishi N, H Shimizu, M Ohtsuka, Y Wakabayashi, H Ito, F Kimura, H Yoshidome, A Kato, Y Nukui, M Miyazaki. 2003. Angiopoietins and Tie-2 expression in angiogenesis and proliferation of human hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 37(5):1105-1131.

Modlin IM and A Sandor. 1997. An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors. *Cancer.* 79(4):813-829.

Modlin IM and LH Tang. 1997. Approaches to the diagnosis of gut neuroendocrine tumors: the last word (today). *Gastroenterology.* 112(2):583-590. Review.

Modlin IM, M Kidd, I Latich, MN Zikusoka, MD Shapiro. 2005. Current status of gastrointestinal carcinoids. *Gastroenterology.* 128(6):1717-1751. Review.

Moon WS, KH Rhyu, MJ Kang et al. 2003. Overexpression of VEGF and Angiopoietin-2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? *Mod Pathol.* 16(6):552-557.

Moon WS, HS Park, KH Yu, KY Jang, MJ Kang, H Park, AS Tarnawski. 2006. Expression of angiopoietin 1, 2 and their common receptor Tie2 in human gastric carcinoma: implication for angiogenesis. *J Korean Med Sci.* 21(2):272-278.

Nakayama T, A Yoshizaki, N Kawahara, A Ohtsuru, CY Wen, M Nakashima, I Sekine. 2004. Expression of Tie-1 and 2 receptors, and angiopoietin-1, 2 and 4 in gastric carcinoma: immunohistochemical analyses and correlation with clinicopathological factors. *Histopathology*. 44(3):232-239.

Nakayama T, M Inaba, S Naito, Y Mihara, S Miura, M Taba, A Yoshizaki, CY Wen, I Sekine. 2007. Expression of Angiopoietin-1, 2 and 4 and Tie-1 and 2 in gastrointestinal stroma tumor, leiomyoma and schwannoma. *World J Gastroenterol*. 13(33):4473-4479.

Nasarre P, M Thomas, K Kruse, I Helfrich, V Wolter, C Deppermann, D Schadendorf, G Thurston, U Fiedler, HG Augustin. 2009. Host-derived angiopoietin-2 affects early stages of tumor development and vessel maturation but is dispensable for later stages of tumor growth. *Cancer Res*. 69(4):1324-1333.

Öberg K. 1994. Treatment of neuroendocrine tumors. *Cancer Treat Rev*. 20(4):331-355. Review.

Öberg K. 1999. Neuroendocrine gastrointestinal tumors – a condensed overview of diagnosis and treatment. *Ann Oncol*. 10 (Suppl 2):3-8. Review.

Öberg K. 2000. State of the art and future prospects in the management of neuroendocrine tumors. *Q J Nucl Med*. 44(1):3-12. Review.

Öberg K, L Astrup, B Eriksson, SE Falkmer, UG Falkmer, J Gustafsen, C Haglund, U Knigge, MH Vatn, M Välimäki. 2004. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours (including bronchopulmonary and thymic neoplasms). *Acta Oncol*. 43(7):626-636.

Ogawa M, H Yamamoto, H Nagano et al. 2004. Hepatic expression of Ang-2 RNA in metastatic colorectal cancer. *Hepatology*. 39(2):528-539.

Oka N, Y Yamamoto, M Takahashi, M Nishitani, HO Kanayama, S Kagawa. 2005. Expression of angiopoietin-1 and -2, and its clinical significance in human bladder cancer. *BJU Int*. 95(4):660-663.

Oliner J, H Min, J Leal, D Yu, S Rao, E You, X Tang, H Kim, S Meyer, SJ Han, N Hawkins, R Rosenfeld, E Davy, K Graham, F Jacobsen, S Stevenson, J Ho, Q Chen, T Hartmann, M Michaels, M Kelley, L Li, K Sitney, F Martin, JR Sun, N Zhang, J Lu, J Estrada, R Kumar, A Coxon, S Kaufman, J Pretorius, S Scully, R Cattley, M Payton, S Coats, L Nguyen, B Desliva, A Ndifor, I Hayward, R Radinsky, T Boone, R Kendall. 2004. Suppression of angiogenesis and tumor growth by selective inhibition of angiopoietin-2. *Cancer Cell*. 6(5):507-516.

Pape UF, M Höcker, U Seuss and B Wiedenmann. 2000. New molecular aspects in the diagnosis and therapy of neuroendocrine tumours of the gastroenteropancreatic system. *Recent Results Cancer Res*. 153:45-60. Review.

Park JH, KJ Park, YS Kim, SS Sheen, KS Lee, HN Lee, YJ Oh, SC Hwang. 2007. Serum angiopoietin-2 as a clinical marker for lung cancer. *Chest*. 132(1):200-206.

Park YS, NH Kim, I Jo. 2003. Hypoxia and vascular endothelial growth factor acutely up-regulate angiopoietin-1 and Tie2 mRNA in bovine retinal pericytes. *Microvasc Res*. 65(2):125-131.

Plöckinger U, B Wiedenmann. 2004. Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltraktes. *Z Gastroenterol*. 42(6):517-527. Review.

Plöckinger U, G Rindi, R Arnold, B Eriksson, EP Krenning, WW de Herder, A Goede, M Caplin, K Öberg, JC Reubi, O Nilsson, G Delle Fave, P Ruszniewski, H Ahlman, B Wiedenmann. 2004. Guidelines for the diagnosis and treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumours. A consensus statement on behalf of the European Neuroendocrine Tumour Society (ENETS). *Neuroendocrinology*. 80(6):394-424. Review.

Plöckinger U, B Wiedenmann. 2005. Endocrine tumors of the gastrointestinal tract. Management of metastatic endocrine tumours. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 19(4):553-576. Review.

Poon RT, ST Fau, J Wong. 2003. Clinical significance of angiogenesis in gastrointestinal cancer: A target for novel prognostic and therapeutic approaches. *Ann Surg*. 238(1):9-28. Review.

Procopio WN, PI Pelavin, WMF Lee, NM Yeilding. 1999. Angiopoietin-1 and -2 Coiled Coil Domains Mediate Distinct Homo-oligomerization Patterns, but Fibrinogen-like Domains Mediate Ligand Activity. *J Biol Chem*. 274(42):30196-30201.

Quartarone E, A Alonci, A Allegra, G Bellomo, L Galabro, A D'Angelo, V del Fabro, A Grasso, M Cincotta, C Musolino. 2006. Differential levels of soluble angiopoietin-2 and Tie-2 in patients with haematological malignancies. *Eur J Haematol*. 77(6):480-485.

Ranno S, M Motta, E Rampello, C Risino, E Bennati, M Malaguarnera. 2006. The chromogranin-A (CgA) in prostate cancer. *Arch Gerontol Geriatr*. 43(1):117-126.

Raymond E, L Dahan, JL Raoul, YJ Bang, I Borbath, C Lombard-Bohas, J Valle, P Metrakos, D Smith, A Vinik, JS Chen, D Hörsch, P Hammel, B Wiedenmann, E Van Cutsem, S Patyna, DR Lu, C Blanckmeister, R Chao, P Ruszniewski. 2011. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 364(6):501-513. Erratum in: *N Engl J Med*. 364(11):1082.

Richard C, G Kim, Y Koikawa et al. 2002. Androgens modulate the balance between VEGF and angiopoietin expression in prostate epithelial and smooth muscle cells. *Prostate*. 50(2):83-91.

Ricke J, KJ Klose, M Mignon, K Öberg and B Wiedenmann. 2001. Standardisation of imaging in neuroendocrine tumours: results of a European delphi process. *Eur J Radiol*. 37(1):8-17. Review.

Rindi G, C Capella and E Solcia. 1998. Cell biology, clinicopathological profile and classification of gastroenteropancreatic endocrine tumors. *J Mol Med.* 76(6):413-420. Review.

Rindi G, ME Candusso and E Solcia. 1999. Molecular aspects of the endocrine tumours of the pancreas and the gastrointestinal tract. *Ital J Gastroenterol Hepatol.* 31 (Suppl 2):135-138.

Rindi G, C Azzoni, S La Rosa, C Klersy, D Paolotti, S Rappel, M Stolte, C Capella, C Bordi, E Solcia. 1999. ECL cell tumor and poorly differentiated endocrine carcinoma of the stomach: prognostic evaluation by pathological analysis. *Gastroenterology.* 116(3): 532-542.

Rindi G, G Klöppel, H Alhman, M Caplin, A Couvelard, WW de Herder, B Eriksson, A Falchetti, M Falconi, P Komminoth, M Körner, JM Lopes, AM McNicol, O Nilsson, A Perren, A Scarpa, JY Scoazec, B Wiedenmann and all other Frascati Consensus Conference participants European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS). 2006. TNM staging of foregut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch.* 449(4):395-401.

Rindi G, G Klöppel, A Couvelard, P Komminoth, M Körner, JM Lopes, AM McNicol, O Nilsson, A Perren, A Scarpa, JY Scoazec, B Wiedenmann. 2007. TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch.* 451(4):757-762.

Rinke A, HH Müller, C Schade-Brittinger, KJ Klose, P Barth, M Wied, C Mayer, B Aminossadati, UF Pape, M Bläker, J Harder, C Arnold, T Gress, R Arnold, PROMID Study Group. 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):4656-4663.

Risau W, V Lemmon. 1988. Changes in the vascular extracellular matrix during embryonic vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Biol.* 125(2):441-450.

Rmali KA, G Watkins, A Douglas-Jones, RE Mansel, WG Jiang. 2007. Angiopoietins lack of prognostic significance in ductal mammary carcinoma. *Int Semin Surg Oncol.* 23:4-6.

Rougier P and E Mitry. 2000. Chemotherapy in the treatment of neuroendocrine malignant tumors. *Digestion* 62 (Suppl 1):73-78. Review.

Saltz L, G Trochanowsky, M Buckley. 1993. Octreotide as an anti-neoplastic agent in the treatment of functional and non-functional neuroendocrine tumours. *Cancer.* 72(1):244-248.

Sarraf-Yazdi S, J Mi, BJ Moeller, X Niu, RR White, CD Kontos, BA Sullenger, MW Dewhirst and BM Clary. 2008. Inhibition of in vivo tumor angiogenesis and growth via systemic delivery of an angiopoietin 2-specific RNA aptamer. *J Surg Res.* 146(1):16-23.

Sato T, Y Tozawa, U Deutsch, K Wolburg-Buchholz, Y Fujiwara, M Gendron-Maguire, T Gridley, H Wolburg, W Risau, Y Qin. 1995. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*. 376(6535):70-74.

Schally AV. 1988. Oncological application of somatostatin analogues. *Cancer Res*. 48:6977-6985. Review.

Schenone S, F Bondavalli, M Botta. 2007. Antiangiogenic agents: an update on small molecule VEGFR inhibitors. *Curr Med Chem*. 14(23): 2495-2516. Review.

Schliemann C, R Bieker, T Prado, T Kessler, H Hintelamm, T Buchner et al. 2006. Expression of angiopoietins and their receptor Tie2 in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 91(9):1203-1211.

Schliemann C, R Bieker, N Thoennissen, J Gerss, R Liersch, T Kessler, T Büchner, WE Berdel, RM Mesters. 2007. Circulating angiopoietin-2 is a strong prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 21(9):1901-1906.

Scholz A, VA Rehm, S Rieke, K Derkow, P Schulz, K Neumann, I Koch, M Pascu, B Wiedenmann, T Berg, E Schott. 2007. Angiopoietin-2 serum levels are elevated in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Am J Gastroenterol*. 102(11):2471-2481.

Sfiligoi C, A de Luca, I Cascone, V Sorbello, L Fuso, R Ponzzone, N Biglia, E Audero, R Arisio, F Bussolino, P Sismondi, M De Bortoli. 2003. Angiopoietin-2 expression in breast cancer correlates with lymph node invasion and short survival. *Int J Cancer*. 103(4):466-474.

Shepherd JJ and GB Senator. 1986. Regression of liver metastases in patients with gastrin-secreting tumour treated with SMS 201-995. *Lancet*. 2(8506):574.

Shirabe K, M Shimada, E Tsujita et al. 2004. Prognostic factors in node-negative intrahepatic cholangiocarcinoma with special reference to angiogenesis. *AM J Surg*. 187(4):538-542.

Shojamanesh H, F Gibril, A Louie, JV Ojeaburu, S Bashir, A Abou-Saif, RT Jensen. 2002. Prospective study of the antitumor efficacy of longterm octreotide treatment in patients with progressive metastatic gastrinoma. *Cancer*. 94(2):331-343.

Söreide AJ, JA van Heerden, GB Thompson, C Schleck, DM Ilstrup, M Churchward. 2000. Gastrointestinal carcinoid tumors: long-term prognosis for surgically treated patients. *World J Surg*. 24(11):1431-1436.

Solcia E, G Klöppel, LH Sobin in collaboration with 9 pathologists from 4 countries. Histological typing of endocrine tumours. International histological classification of tumours, 2<sup>nd</sup> edn. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

Srirajaskanthan R, G Dancey, A Hackshaw, T Luong, ME Caplin, T Meyer. 2009. Circulating angiopoietin-2 is elevated in patients with neuroendocrine tumours and correlates with disease burden and prognosis. *Endocr Relat Cancer*. 16(3):967-976.

Stratmann A, W Risau, KH Plate. 1998. Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *Am J Pathol.* 153(5):1459-1465.

Sun XJ, H Fu, ZH Zhen, MX Wang, YH Liu, KL Sun. 2003. Study on the correlation between expression of angiopoietin-2 (Ang-2) and carcinogenesis, progression of gastric cancer. *Chin J Clin Oncol (Chin).* 30:536-539.

Suri C, PF Jones, S Patan, S Bartunkova, PC Maisonpierre, S Davis, TN Sato and GD Yancopoulos. 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* 87(7):1171-1180.

Syrigos KN, D Sitara, E Georgiou, KJ Harrington. 2002. Cytotoxic therapy of gastroenteropancreatic (GEP) tumors. *Anticancer Res.* 22(2B):1311-1314. Review.

Tait CR and PF Jones. 2004. Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. *J Pathol.* 204(1):1-10. Review.

Takahama M, M Tsutsumi, T Tsujiuchi et al. 1999. Enhanced expression of Tie2, its ligand angiopoietin-1, vascular endothelial growth factor and CD31 in human non small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res.* 5(9):2506-2510.

Takahashi Y, Y Akishima-Fukasawa, N Kobayashi, T Sano, T Kosuge, Y Nimura, Y Kanai, N Hiraoka. 2007. Prognostic value of tumor architecture, tumor-associated vascular characteristics, and expression of angiogenic molecules in pancreatic endocrine tumors. *Clin Cancer Res.* 13(1):187-196.

Takanama I. 2004. Overexpression of Ang-2 mRNA in non-small cell lung cancer: association with angiogenesis and poor prognosis. *Oncol Rep.* 12(4):849-853.

Tanaka F, S Ishikawa, K Yanagihara, R Miyahara, Y Kawano, M Li, Y Otake, H Wada. 2002. Expression of angiopoietins and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 62(23):7124-7129.

Tanaka S, M Mori, Y Sakamoto, M Makuuchi, K Sugimachi, JR Wands. 1999. Biological significance of angiopoietin expression in human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest.* 103(3):341-345.

Tang D, H Nagano, H Yamamoto, H Wada, M Nakamura, M Kondo, H Ota, S Yoshioka, H Kato, B Damdinsuren, S Marubashi, A Miyamoto, Y Takeda, K Umeshita, K Dono, K Wakasa, M Moden. 2006. Angiogenesis in cholangiocellular carcinoma: expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1/2, thrombospondin-1 and clinicopathological significance. *Oncol Rep.* 15(3):525-532.

Taupenot L, KL Harper, DT O'Connor. 2003. The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med.* 348(12):1134-1149. Review.

Teichert-Kuliszewska K, PC Maisonpierre, N Jones et al. 2001. Biological action of angiopoietin-2 in a fibrin matrix model of angiogenesis is associated with activation of Tie2. *Cardiovasc Res.* 49(3):659-670.

- Thurston G. 2003. Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res.* 314(1):61-68. Review.
- Tiling N, J Ricke und B Wiedenmann. 2002. Neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET). *Der Internist.* Springer. Berlin, Heidelberg. Volume 43. Number 2. Seite 210-218.
- Toth-Fejel SE, RF Pommier. 2004. Relationships among delay of diagnosis, extent of disease and survival in patients with abdominal carcinoid tumors. *Am J Surg.* 187(5):575-579.
- Tsigkos S, M Koutsilieris and A Papapetropoulos. 2003. Angiopoietins in angiogenesis and beyond. *Expert Opin Investing Drugs.* 12(6):933-941. Review.
- Van Gompel JJ, RS Sippel, TF Warner, H Chen. 2004. Gastrointestinal carcinoid tumors: factors that predict outcome. *World J Surg.* 28(4):387-392.
- Wada H, H Nagano, H Yamamoto, Y Yang, M Kondo, H Ota, M Nakamura, S Yoshioko, H Kato, B Damdinsuren, D Tang, S Marubashi, A Miyamoto, Y Takeda, K Umeshita, S Nakamori, M Sakon, K Dono, K Wakasa, M Moden. 2006. Expression pattern of angiogenic factors and prognosis after hepatic resection in hepatocellular carcinoma: importance of angiopoietin-2 and hypoxia-induced factor-1 alpha. *Liver Int.* 26(4):414-423.
- Wang HL, CS Deng, J Lin, DY Pan, ZY Zou, XY Zhou. 2007. Expression of angiopoietin-2 is correlated with vascularization and tumor size in human colorectal adenocarcinoma. *Tohoku J Exp Med.* 213(1):33-40.
- Wang J, K Wu, D Zhang, H Tang, H Xie, L Hong, Y Pan, M Lan, S Hu, X Ning, D Fan. 2005. Expressions and clinical significances of angiopoietin-1, -2 and Tie2 in human gastric cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 337(1):386-393.
- Watari M, H Miwa, M Shikami et al. 2002. Expression of endothelial cell-associated molecules in AML cells. *Leukemia.* 16:112-119.
- Wiedenmann B, WW Franke, C Kuhn, R Moll, VE Gould. 1986. Synaptophysin: a marker for neuroendocrine cells and neoplasms. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 83(10):3500-3504.
- Wiedenmann B. 1999. Gastrointestinale neuroendokrine Tumoren. In: Alexander K, W Daniel, HC Diener et al. (Hrsg) *Thieme Innere Medizin.* TIM. Thieme, Stuttgart, New York, S. 640-652.
- Williams ED and M Sandler. 1963. Classification of carcinoid tumours. *Lancet.* 1(7275):238-239.
- Wong MP, SY Chang, KH Fu et al. 2000. The angiopoietins, Tie2 and vascular endothelial growth factor are differentially expressed in the transformation of normal lung to non-small lung carcinoma. *Lung Cancer.* 29(1):11-22.

- Yancopoulos GD, S Davis, NW Gale, JS Rudge, SJ Wiegand, J Holash. 2000. Vascular specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 407(6801):242-248. Review.
- Yao JC. 2007. Neuroendocrine tumors. Molecular targeted therapy for carcinoid and islet-cell carcinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 21(1):163-172. Review.
- Yao JC, M Hassan, A Phan, C Dagohoy, C Leary, JE Mares, EK Abdalla, JB Fleming, JN Vauthey, A Rashid, DB Evans. 2008. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol*. 26(18):3063-3072. Review.
- Yao JC, MH Shah, T Ito, CL Bohas, EM Wolin, E Van Cutsem, TJ Hobday, T Okusaka, J Capdevila, EG de Vries, P Tomassetti, ME Pavel, S Hoosen, T Haas, J Lincy, D Lebwohl, K Öberg; RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumors, Third Trial (RADIANT-3) Study Group. 2011. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 364(6):514-523.
- Ye F, M Florian, SA Magder, SNA Hussain. 2002. Regulation of angiopoietin and Tie-2 receptor expression in non-reproductive tissues by estrogen. *Steroids*. 67(3-4):305-310.
- Yu Q and I Stamenkovic. 2001. Angiopoietin-2 is implicated in the regulation of tumor angiogenesis. *Am J Pathol*. 158(2):563-570.
- Zagzag D, A Hooper, DR Friedländer et al. 1999. In situ expression of angiopoietins in astrocytomas identifies angiopoietin-2 as an early marker of tumour angiogenesis. *Exp Neurol*. 159(2):391-400.
- Zao ZC, SS Zheng, YL Wan et al. 2004. The effect of pro-angiogenesis factors and their receptors on angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi (Chin J Oncol)*. 26(8):472-475.
- Zhang J, Z Jia, Q Li, L Wang, A Rashid, Z Zhu, DB Evans, JN Vauthey, K Xie, JC Yao. 2007. Elevated Expression of vascular endothelial growth factor correlates with increased angiogenesis and decreased progression-free survival among patients with low-grade neuroendocrine tumors. *Cancer*. 109(8):1478-1486.
- Zhang ZL, ZS Liu, Q Sun. 2006. Expression of angiopoietins, Tie2 and vascular endothelial growth factor in angiogenesis and progression of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. Jul 14. 12(26):4241-4245.
- Zhou Y, XQ Fang, H Li, YT Diao, YF Yang, DL Zhao, K Wu, HQ Li. 2007. Role of serum angiopoietin-2 level in screening for esophageal squamous cell cancer and its precursors. *Chin Med J*. 120(14):1216-121.

## 8. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Probennummer, Initialen, Geschlecht, Primarius und Alter der in der Studie eingeschlossenen Patienten .....	17
-------------------	---	----

## 9. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten (n=90) vs. Kontrollgruppe	21
<b>Abbildung 2:</b>	Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten (n=42) vs. Kontrollgruppe	22
<b>Abbildung 3:</b>	Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit von der Primärlokalisation.....	23
<b>Abbildung 4:</b>	Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit von der Funktionalität.....	24
<b>Abbildung 5:</b>	Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten unterschiedlicher TumorgroÙe (T1 bis T4). .....	25
<b>Abbildung 6:</b>	Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit vom N-Status.....	26
<b>Abbildung 7:</b>	Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit von der Metastasierung. ....	27
<b>Abbildung 8:</b>	Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten ohne versus mit Leberfiliae .....	28
<b>Abbildung 9:</b>	Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten ohne und mit Angioinvasion .....	29
<b>Abbildung 10:</b>	Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten ohne und mit Lymph-angioinvasion. ....	30
<b>Abbildung 11:</b>	Ang-2-Serumspiegel bei NET-Patienten in Abhängigkeit vom Tumorgrading .....	31
<b>Abbildung 12:</b>	Ang-2-Serumspiegel in Abhängigkeit vom CgA-Serumspiegel bei NET-Patienten. ....	32
<b>Abbildung 13:</b>	Überlebenskurve nach Kaplan-Meier von NET-Patienten mit niedrig/durchschnittlichem Ang-2-Serumspiegel und hohem Ang-2-Serumspiegel. ....	33

## 10. Abkürzungsverzeichnis/Glossar

Akt	Signaltransduktionsprotein, Proteinkinase
AML	Akute myeloische Leukämie
Ang-1	Angiopoietin-1
Ang-2	Angiopoietin-2
Ang-3	Angiopoietin-3
Ang-4	Angiopoietin-4
BON-Zellen	Pankreaskarzinoidzellen
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CCC	Cholangiocellular carcinoma
CgA	Chromogranin A
CT	Computertomographie
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
5-HIES	5-Hydroxyindolessigsäure
5-J-ÜLT	5-Jahres-Überlebensrate
95%-KI	95%-Konfidenzintervall
GEP	gastroenteropankreatisch
GEP-NET	gastroenteropankreatischer Neuroendokriner Tumor
HCC	Hepatocellular carcinoma
HR	Hazard Ratio
IFN-alpha	Interferon-alpha
ISH	In situ Hybridisierung
kDa	Kilodalton
Ki-67	Ki-67-Antigen
LVD	Lymphatic vessel density
max.	maximal
Med.	Medizinische
µl	Mikroliter
ml	Milliliter

MRT	Magnetresonanztomographie
mRNA	messenger ribonucleic acid
m. S.	mit Schwerpunkt
MVD	Microvessel density
n. d.	nicht definiert
NET	Neuroendokriner Tumor
nm	Nanometer
NSCLC	Non small cell lung cancer
NSE	Neuronenspezifische Enolase
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pg	Pikogramm
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMA	Phorbol myristate acetate
rh	Recombinant human
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SRS	Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie
sTie-2	soluble Tunica interna endothelial cell kinase 2
Tie-2	Tunica interna endothelial cell kinase 2
TNF-alpha	Tumor necrosis factor alpha
TNF-beta	Tumor necrosis factor beta
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VIP	Vasoactive intestinal peptide
vs.	versus
WHO	World health organization
z. B.	zum Beispiel

## **11. Curriculum vitae**

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

## 12. Danksagung

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. B. Wiedenmann für die freundliche Überlassung des Themas.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt Dr. A. Scholz für die großartige Betreuung und fortwährende Unterstützung, seine konstruktive Kritik und die vielen wertvollen Ratschläge. Deine Hilfe hat wesentlich zum Entstehen der vorliegenden Promotion beigetragen.

Große Dankbarkeit und Respekt empfinde ich dir gegenüber Kate. Es ist nicht selbstverständlich jemand völlig Fremden so selbstlos zu unterstützen. Ohne Dich wäre es für mich in der so unerwarteten Situation sicherlich wesentlich schwerer gewesen, den Mut nicht zu verlieren und die Überarbeitung zu bewerkstelligen.

Ganz kurzfristig und in großer Not – vielen Dank Helen.

Für die gelungene Zusammenarbeit danke ich den Labormitarbeitern aus der Arbeitsgruppe von Dr. A. Scholz: Svenja Rieke, Annett Rexin, Sandra Rudloff, Petra Schulz und allen anderen Mitarbeitern, einschließlich Antje Lischewsky.

Des Weiteren bin ich Birgit und Jurij für eine außergewöhnliche Freundschaft und insbesondere die Zeit während meines Studiums dankbar und sehr verbunden.

Ich danke Monika und Dr. Klaus Köper für die immer wieder aufmunternden Worte und das Korrekturlesen.

Christian – Danke, dass Du immer für mich da warst und in einigen schweren Zeiten liebevoll an meiner Seite gestanden hast.

Vor allem möchte ich jedoch von ganzem Herzen meinen Eltern für Ihre bedingungslose Unterstützung und Förderung meiner Entwicklung und Persönlichkeit danken, ohne die mein Studium und diese Dissertation nicht möglich gewesen wären.

## **Erklärung an Eides Statt**

Hiermit erkläre ich, Antje Deters, geboren am 16.12.1974 in Crivitz, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde und dass die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt. Die benutzten Hilfsmittel sowie die verwendete Literatur sind vollständig angegeben.