

Aus dem
Charité Centrum für Magen-, Darm-, Nieren- und Stoffwechselmedizin
Medizinische Klinik für
Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie, Campus Benjamin Franklin
Direktor: Prof. Dr. M. Zeitz

Habilitationsschrift

Innovative Ansätze in der Diagnostik und Therapie gastrointestinaler Tumore: Apoptose- und Zellzyklus-regulierende Proteine und ihre Bedeutung

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Frau Dr. med. Patricia Grabowski

aus Berlin

Eingereicht: Dezember 2009

Dekanin: Frau Professorin Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

Gutachter: 1. Prof. Dr. T. Seufferlein
2. Prof. Dr. S. Hauptmann

Für Stella und Jonathan

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
1. Einleitung	6
1.1 Gastrointestinale Tumore	6
1.1.1 Kolorektale Karzinome.....	7
1.1.2 Ösophaguskarzinome.....	10
1.1.3 Gastroenteropankreatische neuroendokrine Karzinome.....	12
1.2 „Targets“ – Angriffspunkte zielgerichteter Krebstherapien	17
1.2.1 Apoptose und Zellzyklus	17
1.2.1.1 Zellzyklusregulation	17
1.2.1.1.1 Cykline und deren Inhibitoren.....	18
1.2.1.1.2 Apoptoseregulation.....	19
1.2.1.1.2.1 p53	19
1.2.1.1.2.2 Inhibitor-of Apoptosis-Familie: Survivin.....	21
1.2.1.1.2.3 Mitochondrialer Apoptose-Signalweg: PBR	23
1.2.2 Andere Zielproteine	26
1.2.2.1 SialylLe ^X	26
1.3 Fragestellung und Zielsetzung	28
1.3.1 „Der perfekte Biomarker“	28
1.3.2 Welche Nachweismethode ist geeignet ?.....	29
1.3.3 Interessante Patientenkollektive.....	30
1.3.4 Ziel-Proteine.....	31
1.3.5 Ätiopathogenese von neuroendokrinen Tumoren.....	32
2 Ergebnisse und Diskussion	33
2.1 Expression und prognostische Bedeutung verschiedener neuer Markerproteine bei kolorektalen Karzinomen	33
2.1.1 Expression of sialyl-Le ^X antigen defined by MAb AM-3 is an independent prognostic marker in colorectal carcinoma patients. Int. J. Cancer 2000, 88: 281-286.....	38
2.1.2 Neuroendocrine differentiation is a relevant prognostic factor in stage III-IVcolorectal cancer. Eur. J. Gastroenterol Hepatol 2001, 13: 405-411.....	44
2.1.3 Low bax protein expression is a negative prognostic factor in primary colorectal cancer. Int. J. Cancer 2002, 99: 589-596	51
2.1.4 Overexpression of the peripheral benzodiazepine receptor is a relevant prognostic factor in stage III colorectal cancer. Clin. Cancer Res. 2002, 8(10): 3205-3209	59
2.1.5 Prognostic value of multimarker analysis in colorectal cancer: one step forward towards an individualized therapy decision. Onkologie 2004, 28: 399-403	64

2.1.6	Up-regulation of the peripheral benzodiazepine receptor during human colorectal carcinogenesis and tumor spread. Clin. Cancer Res. 2005,11(5): 1751-1756.....	69
2.1.7	Analysis of neuroendocrine differentiation and the p53/BAX pathway in UICC stage III colorectal carcinoma identifies patients with good prognosis. Int. J. Colorectal Dis 2006, 21: 221-230.....	75
2.2	Wachstumshemmende Effekte spezifischer Liganden des PBR auf gastrointestinale Tumorzelllinien.....	85
2.2.1	Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human esophageal cancer cells. Int J. Cancer 2002, 102(4): 318-327	92
2.2.2	Cell cycle related signaling pathways modulated by peripheral benzodiazepine receptor ligands in colorectal cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 2004, 324: 878-886	102
2.2.3	Peripheral benzodiazepine receptor ligands induce apoptosis and cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cells and enhance chemosensitivity to paclitaxel, docetaxel, doxorubicin and the Bcl-2 inhibitor HA14-1. J.Hepatol. 2004, 41(5): 799-807	111
2.3.	Expression und prognostische Bedeutung von Survivin bei gastrointestinalen Tumoren	120
2.3.1	Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. Br. J. Cancer 2003, 88(1): 115-119.....	124
2.3.2	Nuclear survivin is a powerful novel prognostic marker in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease. Neuroendocrinology 2005, 81: 1-9 ...	129
2.4	Molekulare Charakteristika neuroendokriner Tumore und Karzinome	138
2.4.1	Expression of neuroendocrine markers: A signature of human undifferentiated carcinoma of the colon and rectum. Virchows Arch 2002, 441(3): 256-263	142
2.4.2	Loss of nuclear p27 expression and its prognostic role in relation to cyclin E and p53 mutation in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Clin.Cancer Res. 2008, 14: 7378-7384.....	150
2.4.3	Molecular characteristics and predictors of survival in patients with malignant neuroendocrine tumors. Int. J. Cancer 2008, 123(7): 1556-1564.....	157
3	Zusammenfassung	166
4	Literaturverzeichnis	172
5	Verzeichnis der dieser Arbeit zugrunde liegenden Publikationen.....	192
6	Danksagung.....	197
7	Eidesstattliche Erklärung.....	200

Abkürzungen

ANT	Adenin-Nukleotid-Translokator
APC	Adenomatöse polyposis coli Gen
Bax	Bcl-2-assoziiertes X Protein
Bcl-2	B-cell CLL/Lymphom 2
Bcl-XL	Bcl-2-like 1
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CIMP	CpG island Methylator Phänotyp
DCC	Deleted in colorectal cancer gene
ERK1/2	Extrazelluläres Signal-regulierte Kinase
FGIN-1–27	N,N-di-n-hexyl-2-(4-fluorophenyl)indole-3-acetamid
gadd	growth arrest and DNA-damage- inducible gene
GEP-NET	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumoren
LOH	loss-of-heterozygosity
MAPKinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PBR	Peripherer Benzodiazepinrezeptor
PK 11195	1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3 isoquinolinecarboxamid
Ro5-4864	4-Chlorodiazepam
SialylLe ^x	Sialyl-Lewis X
SNARE	Löslicher <i>N</i> -ethylmaleimid-sensitiver-Factor anhaftender Rezeptor
SNAP	lösliche <i>N</i> -ethylmaleimid-sensitiver-Factor –Proteine
SNAP25	Synaptosomal-assoziiertes Protein
UICC	Union International Contre le Cancer
VAMP	Vesikel-assoziiertes Membranprotein
VDAC	Voltage-dependent anion channel (= Porin)

1 Einleitung

1.1 Gastrointestinale Tumore

Gastrointestinale Tumore sind mit einer weltweiten Zahl von ca. 2 Millionen Neuerkrankungen und 1,2 Millionen Sterbefällen pro Jahr die häufigsten malignen Tumoren des Menschen. Sie sind zumeist Erkrankungen des Alters, so dass bei kontinuierlich steigender Lebenserwartung in den westlichen Industrienationen ihre relative und absolute Häufigkeit kontinuierlich zunimmt. Gastrointestinale Tumoren werden somit zukünftig ein bedeutendes klinisches und gesundheitsökonomisches Problem darstellen. Ihre Prognose ist oft schlecht, da sie meistens zu spät diagnostiziert werden und die therapeutischen Optionen dann nur noch eingeschränkt sind. Um diesen Problemen zu begegnen, müssen Strategien entwickelt werden, die eine Identifikation von Risikopatienten und Tumoren im Frühstadium erlauben und auf eine breitere Akzeptanz in der Bevölkerung stossen. Es sollten prognostische und prädiktive Biomarker entwickelt und in der Klinik eingesetzt werden, die auch imstande sind, eine individuelle Therapie in den verschiedenen Stadien einer Tumorerkrankung zu lenken.

In den vergangenen 25 Jahren hat eine beispiellose Entwicklung in der biomedizinischen Forschung stattgefunden. Eine detaillierte Übersicht über die einzelnen biochemischen Entwicklungen findet sich bei (Röcken et al., 2008). Sowohl die Entschlüsselung mehrerer vererbbarer Tumorleiden des Gastrointestinaltraktes wie z.B. der familiären Polyposis Coli (FAP) und des hereditären nicht polypösen kolorektalen Karzinoms (HNPCC), als auch die wissenschaftliche Untersuchung von sog. „epigenetischen Phänomenen“, also den pathogenetischen Mechanismen, die zur Neu-Entstehung von Tumoren führen, fallen in diese Zeit. Hierzu zählt die Erkenntnis über die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ebenso wie über die aktivierenden Mutationen wie die des k-ras-Genes, das bereits jetzt routinemässig bei der Diagnostik des kolorektalen Karzinoms untersucht werden soll. Unser zunehmendes Wissen um die Pathologie und Pathogenese gastrointestinaler Tumoren hat auch zur Identifikation neuer Therapie-„targets“ und zur Entwicklung neuer Medikamente geführt. So werden neben den „klassischen“ Chemotherapeutika wie z.B. 5-FU, Irinotecan, Oxaliplatin zunehmend sogenannte „biologicals“ eingesetzt, die aus teilweise humanisierten Antikörpern und Antikörper-Fragmenten bestehen oder sogenannte „small molecules“ sind, die gegen Rezeptor-Tyrosinkinasen von Wachstumsfaktoren (wie z.B. die EGFR-Familie) oder Angiogenesefaktoren (wie z.B. VEGFR) gerichtet sind. Dabei wird durch die Anti-Rezeptor-Antikörper (wie z.B. Cetuximab) die Signaltransduktion direkt am extrazellulären Rezeptor gehemmt, während die „small molecules“ (wie z.B. Erlotinib) an den intrazellulären

Tyrosinkinase durch Konkurrenz mit ATP angreifen und so zur Hemmung der Phosphorylierung und Signaltransduktion führen.

Trotz dieser enormen Entwicklungen bleiben grundlegende Probleme im klinischen Alltag bestehen, die die Tumoren des Gastrointestinaltraktes noch immer mit einer schlechten Prognose verknüpfen. Dies betrifft zum einen die zu späte Diagnose, trotz mehr oder weniger invasiver Verfahren, wie Ösophago-Gastro-Duodenoskopie oder Koloskopie, die zwar den Goldstandard darstellen, aber aufgrund der geringen Akzeptanz der Patienten nur eingeschränkt wirksam werden. Weiterhin haben die bisher einsetzbaren serumbasierten „Tumormarker“ eine zu geringe Sensitivität, um Karzinome im potentiell kurativen (Früh-) Stadium zu detektieren. Zum zweiten ist trotz zunehmender Kenntnisse über die molekularen Mechanismen der Pathogenese gastrointestinaler Tumore die medikamentöse Therapie noch weitgehend Organ-orientiert, und zu wenig patienten-individualisiert. Erster erfolgsversprechender Ansatz ist zum Beispiel die routinemässige Bestimmung des k-ras-Mutationsstatus beim kolorektalen Karzinom, nach dessen Typus (mutiert-nicht mutiert) sich die Behandlung mit den EGFR-Inhibitoren richtet. Dennoch wird oft genug die intrinsische und/oder erworbene Chemoresistenz des Tumors nicht prospektiv evaluiert, sondern sozusagen im Nachhinein ermittelt. Es fehlt also a) an Früherkennung von Tumoren mit nicht-invasiven Methoden; b) eine bessere Abschätzung des biologischen Verhaltens des Tumors (also der Prognose des Patienten) und c) eine Verbesserung der Vorhersagbarkeit des Therapieansprechens (also die Prädiktion eines bestimmten Markers), damit man zu einer tumor- und patientenindividualisierten Therapie gelangt.

Ich habe in meiner Arbeit verschiedene vielversprechende Zellzyklus- und Apoptose-relevante Proteine untersucht, die teils einer besseren Diagnostik gastrointestinaler Tumorerkrankungen dienen können und teils auch schon (prä-)klinisch therapeutisch angegangen werden. Hierbei habe ich tumorbiologisch höchst unterschiedliche Karzinome des Gastrointestinaltraktes untersucht, namentlich kolorektale Karzinome, Ösophaguskarzinome und neuroendokrinen Tumore, die im Folgenden genauer dargestellt werden sollen. Der Fokus liegt hierbei naturgemäß auf dem aktuellen Stand der Diagnostik und Therapie dieser Tumore, die die jetzige Prognose bestimmen

1.1.1 Kolorektale Karzinome

Das kolorektale Karzinom (CRC) ist in der westlichen Welt eine der häufigsten malignen Erkrankungen und belegt bei den tumorbedingten Todesursachen den 2. Platz. Allein in Deutschland wurden nach Angaben des Robert-Koch-Institutes 2006 ca. 71.000 Neuer-

krankungen und 29.000 Todesfälle registriert. Die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate ist stadienabhängig sehr unterschiedlich. Während die Überlebensrate von Patienten im frühen Erkrankungsstadium (UICC I) nach der operativen Entfernung des Tumors >90% (T1) und 85% (T2) beträgt, ist schon im Stadium IIb (T4) mit einer deutlichen Abnahme der 5-Jahresüberlebensrate auf 72% zu rechnen. Wenn bei der Erstdiagnose lokale Lymphknotenmetastasen (UICC III) vorliegen, sinken die 5-Jahresüberlebensraten weiter und liegen bei 44 - 83 % (O'Connell et al., 2004). Wegen der sehr unterschiedlichen Überlebensraten wird das Stadium III seit 2004 in 3 Untergruppen (IIIa – IIIc) aufgeteilt (O'Connell et al., 2004) je nach Tumoreindringtiefe und Zahl der betroffenen Lymphknoten. Kolorektale Karzinompatienten mit fernmetastasierenden Tumoren weisen nur noch eine 5-Jahres-Überlebensrate von 5-30% auf. Aufgrund der o.g. divergenten Prognose empfiehlt die aktuelle S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselerkrankungen stadiengerecht Folgendes (Schmiegel et al., 2008): Nach einer R0-Resektion im UICC-Stadium III soll eine regelhafte 6-monatige Chemotherapie durchgeführt werden. Im Vergleich zum historischen Mayo-Protokoll (5-FU-Bolus-Prinzip) (Moertel et al., 1995) ist die infusionale Gabe und inzwischen auch die orale Gabe von 5-FU gleich effektiv bei geringeren Nebenwirkungen (Glen and Cassidy, 2008). Wenn möglich, sollte eine Kombinationschemotherapie mit Oxaliplatin durchgeführt werden (Andre et al., 2004). Für das Stadium II ist die Datenlage weniger eindeutig, so dass die S3-Leitlinie eine eindeutige Chemotherapieempfehlung nur bei zusätzlichen Risikofaktoren (T4-Tumor, Tumorperforation, geringe Differenzierung, Ileus, Veneninvasion, < 10 Lymphknoten untersucht) ausspricht (Schmiegel et al., 2008). Im Stadium UICC IV ist der Nutzen einer palliativen Chemotherapie sowohl auf das progressionsfreie Überleben als auch auf das Gesamtüberleben eindeutig belegt.

Die Karzinogenese kolorektaler Tumore ist ein gut untersuchter Prozess, bei dem eine typische Abfolge genetischer Alterationen mit morphologischen Veränderungen auftritt. Es können anhand der molekularen Veränderungen zwei unterschiedliche Phänotypen charakterisiert werden. Der „klassische“ genetische Phänotyp, der 50-70% aller sporadischen kolorektalen Karzinome ausmacht, zeigt eine klassische Adenom-Karzinom-Sequenz mit Alterationen im APC/ β -catenin-Weg, p53-Mutationen, Genveränderungen mit loss-of-heterozygosity (LOH) auf 5q, 17p, 18q (Kinzler and Vogelstein, 1996; Hanski and Itzkowitz, 2000). Demgegenüber steht der CpG Island-Methylatorphänotyp (CIMP+), der eine epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen aufweist. Häufig gehen diese Tumore mit einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI+) einher infolge einer Promotormethylierung des

Mismatch-Repair-Gens hMLH1. Diese Tumoren sind eher rechtsseitig im Colon lokalisiert und nicht selten High-grade Karzinome mit muzinöser oder siegelringzelliger Differenzierung (Übersicht bei (Tischhoff und Tannapfel, 2008). Des Weiteren ist seit langem bekannt, dass Patienten mit langjähriger (Pan)Colitis ulzerosa ein erhöhtes Risiko haben, Dysplasien und Adenokarzinome des Dickdarms zu entwickeln (Munkholm, 2003), was für einen Wachstumsreiz aus Mediatoren der chronischen Entzündung wie z.B. der Zytokine spricht. Das zeitlich regulierte Auftreten bestimmter prognostischer Markerproteine innerhalb der Adenom-Karzinom-Sequenz legt nahe, dass diese Proteine möglicherweise eine funktionelle Rolle für die Karzinogenese und Tumorprogression spielen. Dennoch ist es bisher – mit Ausnahme des k-ras-Gens in der palliativen Situation - nicht gelungen, Proteine zu definieren, die prognostisch oder prädiktiv zum Beispiel das Ansprechen auf eine konventionelle Chemotherapie voraussagen können und Eingang in die klinische Routine gefunden hätten. Zwar ist es möglich, mit Mitteln der modernen Molekularbiologie spezifische Gene und ihre Mutationen zu identifizieren, die im fortgeschrittenen Tumorstadium von Bedeutung sein könnten. Z.B. haben Braun und Kollegen retrospektiv 11 Biomarker, darunter bekannte „Kandidaten“ wie MLH1/MSH2, p53, Topoisomerase I, ERCC1, MGMT und Cox2 analysiert und dabei eine Subpopulation mit hoher Topoisomerase I Expression identifiziert, die von Irinotecan und möglicherweise auch Oxaliplatin profitiert (Braun et al., 2008). Prospektive Studien hierzu fehlen aber. Der Nachweis der kras-Mutation, der inzwischen regelhaft beim metastasierten kolorektalen Karzinom durchgeführt werden sollte und auch bei der Zulassung von neuen sogenannten „zielgerichteten molekularen Therapien“ eine Rolle spielt, ist schon eher von klinischer Bedeutung: Nur bei Vorliegen des Wildtyp-k-ras Gens ist eine Therapie mit EGFR-antagonisierenden Substanzen wirksam (Van Cutsem et al., 2009; Bokemeyer et al., 2009). Andere, „small-molecules“ wie Erlotinib, scheinen nur wirksam zu sein, wenn eine bestimmte Art von akneiformen Hautausschlag bei den Patienten auftritt, so nachgewiesen beim fortgeschrittenen Pankreaskarzinom in der Kombinationstherapie mit dem „Standard“ Gemcitabine (Moore et al., 2007). Die molekularen Grundlagen dieser klinischen Beobachtungen sind Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung.

Für die früheren Stadien des kolorektalen Karzinoms, insbesondere das so prognostisch heterogene Stadium UICC III, wird intensiv nach diagnostischen Möglichkeiten zur Früherkennung der Patienten gesucht, die innerhalb des Gesamtkollektivs eine schlechtere Prognose haben und die dementsprechend anders behandelt werden müssen. Wünschenswert wäre, zum Zeitpunkt der Diagnose eine Stratifizierung in Hoch-Risiko-Gruppen und weniger gefährdete Patienten durchzuführen, nicht zuletzt auch, um Über-Therapien und damit

verbundene Kosten und Nebenwirkungen zu vermeiden. Ein wegweisender Ansatz in diese Richtung könnte die aktuelle Arbeit von der Gruppe um Birchmeier und Schlag sein, die zeigen konnten, dass eine hohe Aktivität des Gens „Metastasis associated in colon cancer 1“ (MACC1) sowohl Tumorwachstum als auch Zellabsiedlung fördert (Stein et al., 2009).

1.1.2 Ösophaguskarzinome

Beim Ösophaguskarzinom existieren zwei histologische Typen: Das Plattenepithel- und das Adenokarzinom. In Deutschland sind etwa 80 % der Ösophaguskarzinome plattenepithelialen Ursprungs, etwa 10–15 % entstehen auf der Grundlage von zylindrischem Barrett-Epithel (Adenokarzinome). Das Adenokarzinom des gastrooesophagealen Übergangs ist eine der am schnellsten zunehmenden Tumorentitäten in den westlichen Industrienationen mit Inzidenzen zwischen 3 und 9 Fälle/100.000 Einwohner (Blot and McLaughlin, 1999; Bollschweiler and Holscher, 2001) - wohl aufgrund der zunehmenden ernährungsbedingten Risikofaktoren wie das Übergewicht - während die Inzidenz des Plattenepithelkarzinoms weitgehend konstant geblieben ist. Allerdings stellt auch der eher zunehmende Alkohol- und Tabakkonsum ein großes sozioökonomisches Problem dar und wird inzwischen auch als Risikofaktor für die Entwicklung eines Adenokarzinoms der Speiseröhre betrachtet. Die meisten Ösophaguskarzinome werden aufgrund fehlender Frühsymptomatik erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (75% im UICC Stadium III und IV (Bareiss et al., 2002). Da sich die Prognose vor allem nach dem Tumorstadium bei Beginn der Therapie richtet (Abou-Alfa et al., 2006), ist die 5-Jahres-Überlebensrate aller diagnostizierten Fälle mit insgesamt um die 20% ungünstig (Robert-Koch-Institut, 2008). Zusätzlich haben diese Patienten oftmals Begleiterkrankungen, die die Operabilität einschränken. Demgegenüber stehen die sehr guten Operationsergebnisse in den frühen Tumorstadien, die auf die Mucosa oder Submucosa beschränkt sind: Hier sind durch die alleinige chirurgische respective sogar endoskopische (Mucosa-) Resektion 5-Jahres-Überlebensraten von 70-95% möglich (Holscher et al., 1995). Bei fortgeschrittenen, aber lokoregionär resektablen Tumoren gewinnen multimodale Therapieansätze an Bedeutung. Im Zentrum der Therapieregime steht heutzutage noch immer - wenn technisch machbar - eine onkologische Resektion des Tumors, flankiert von neoadjuvanten oder adjuvanten Konzepten aus Chemo- oder Radiochemotherapien. Beim Plattenepithelkarzinom wird diskutiert, ob im lokal fortgeschrittenen Stadium eine definitive Radiochemotherapie ohne nachfolgende Resektion eine ausreichende Therapieoption darstellt. Hierfür gibt es Hinweise aus einigen Studien (Di Fiore et al., 2006). Darüber hinaus wird die Rolle des PET als „Response prediction“ bei neoadjuvanten Therapien als Option für

eine Individualisierung der Tumortherapie diskutiert (Lordick et al., 2007). Einschränkend muss man anmerken, dass das PET niemals eine pathologisch komplette „response“ wird vorhersagen können. Zur Zeit ist diese „early response evaluation“ beim Plattenepithelkarzinom noch als wissenschaftlich in der Untersuchungsphase zu bewerten.

Auch für das Adenokarzinom des Ösophagus hat aufgrund von Daten aus Metaanalysen die neoadjuvante kombinierte Radiochemotherapie Vorteile gebracht. Allerdings zeigten mehrere neuere Phase III-Studien, die neben Magenkarzinomen auch die sich offensichtlich tumorbiologisch ähnlich verhaltende Adenokarzinome der Speiseröhre eingeschlossen hatten, einen deutlichen Überlebensvorteil für eine neoadjuvante Chemo-therapie mit nachfolgender Operation (Cunningham et al., 2006). Eine Erweiterung dieser neoadjuvanten Chemo-therapieprotokolle um zielgerichtete Therapien wird derzeit in klinischen Studien untersucht (z.B. MAGIC 2).

Im metastasierten Stadium geht es vor allem beim Plattenepithelkarzinom um eine symptomorientierte Therapie. Hier steht die Sicherung der Nahrungspassage im Vordergrund, wie sie zum einen durch endoskopische Verfahren mit Einlage von Stents oder aber auch durch lokal-ablative Verfahren erreicht werden kann. Auch die palliative Radiotherapie, entweder perkutan oder als Brachytherapie hat ihren Stellenwert. Eine systemische Chemotherapie bei einer Lebenserwartung von > 6 Monaten mit „Platin-haltigen Protokollen“ ist sinnvoll. Gerade konnte die Arbeitsgemeinschaft internistische Onkologie in einer randomisierten Phase II–Studie, an der sich auch unsere Klinik beteiligt hat, zeigen, dass der Zusatz von „biologicals“ in dem Fall Cetuximab als EGFR-Inhibitor, die Effektivität der „konventionellen Chemotherapie“ erhöhen kann (Lorenzen et al., 2009). Die palliative Chemotherapie beim Adenokarzinom des Ösophagus richtet sich nach den Therapieoptionen beim Magenkarzinom mit 5-FU/platin-haltigen Protokollen. Nichtsdestotrotz sind die hier beschriebenen Therapieoptionen alles andere als befriedigend und es wird auch bei dieser Tumorentität nach prognostisch und prädiktiv einsetzbaren Markern gesucht, die eine patienten-individualisierte Tumortherapie erlauben würden.

Beim Karzinom der Speiseröhre ist allerdings im Vergleich zum kolorektalen Karzinom über die Pathogenese deutlich weniger bekannt. Wahrscheinlich erfolgt auch beim Adenokarzinom des Ösophagus die maligne Transformation, ähnlich wie beim Kolon-karzinom, mehrstufig. Patienten mit chronischer Refluxkrankheit entwickeln häufig einen sogenannten Barrett-Ösophagus, bei dem sich das normale Plattenepithel des distalen Ösophagus in eine intestinale Metaplasie mit spezialisiertem Zylinderepithel umgewandelt hat. Aus der Metaplasie kann sich über die weiteren Schritte der gering- und hochgradigen Dysplasie ein Adenokarzinom

der distalen Speiseröhre entwickeln (Shaheen and Ransohoff, 2002). Die Mechanismen, die zur malignen Transformation und Tumorprogression des Plattenepithelkarzinoms führen, sind bisher weniger verstanden. Chronische Irritation der Ösophagusschleimhaut durch chronischen Alkoholabusus, insbesondere mit Nikotinabusus, stellen mit 90% den Hauptrisikofaktor für das Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre dar (Brown et al., 2001). Auf molekularer Ebene hat die Gruppe unserer Kooperationspartner Prof. Daniel/ Prof. Dörken wertvolle Hinweise durch retrospektive Untersuchungen an Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Speiseröhre gewinnen können. Der Verlust des proapoptotischen BAX-Proteins (Sturm et al., 2001), die geringe Expression der Zellzyklus-arretierenden Proteine p16, p21 und Rb sowie eine Überexpression des Cyklin D1 (Güner et al., 2003) sind nach ihren Analysen mit einer deutlich schlechteren Prognose für die Patienten verbunden und scheinen somit für die Tumorprogression eine Rolle zu spielen. Beim Adenokarzinom wiederum sind die Mutationen des p53-Gens wohl von besonderer Bedeutung (Montesano et al., 1996).

1.1.3 Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore (GEP-NET)

GEP-NETs stellen eine relativ seltene und sehr heterogene Tumorentität dar, auch wenn neuere Untersuchungen eine Zunahme der Inzidenz vermuten lassen (Modlin et al., 2008). Entsprechend der neuen WHO-Klassifikation (Solcia et al., 2000) werden sie in gut differenzierte endokrine Tumore (früher als „Karzinoide“ bezeichnet), gut differenzierte endokrine Karzinome („maligne Karzinoide“) und schlecht differenzierte endokrine Karzinome („undifferenzierte, klein – oder großzellige Karzinome“) eingeteilt. Tumorbiologisch ist diese Entität somit hoch interessant, weil sie das gesamte Spektrum der benignen Tumore bis hin zu den hochmalignen Karzinomen abdeckt. Die zur Einordnung entscheidenden Kriterien sind laut WHO-Klassifikation neben Tumorgröße, Morphologie der Tumorzellen, Angioinvasion, Anzahl der Mitosen und Erfassung des Proliferationsindex (ki-67 Expression) auch die Lokalisation der Primärtumors, wie sie bereits 1963 von Williams und Sandler (Williams and Sandler, 1963) vorgeschlagen wurde: „*foregut*“ Tumore finden sich im Bereich der embryonalen Vorderdarmanlage (Thymus, Lunge, Bronchien, Speiseröhre, Magen, Bauchspeicheldrüse, Zwölffingerdarm, oberes Jejunum); „*midgut*“ Tumore (Mitteldarm) betreffen den restlichen Dünndarm und Dickdarm bis zum mittleren Kolon transversum und „*hindgut*“ Tumore (Hinterdarm) sind im restlichen Kolon und Rektum lokalisiert. Diese Einteilung nur nach embryogenetischen Gesichtspunkten wird der biologischen Vielfalt der Tumoren aber nicht gerecht. 2006 wurde von der European

Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) ein Vorschlag für eine tumor-node-metastasis-(TNM)-Klassifikation und Grading zunächst für foregut-Tumoren entwickelt (Rindi et al., 2006). Der TNM-Vorschlag orientiert sich zum einen an dem TNM System solider Tumore der Organe des Vorderdarms und zum anderen an der WHO-Klassifikation, bzgl. des „Grading“. Ein TNM System für Tumore des Mitteldarms und Hinterdarms wurde 2007 entsprechend veröffentlicht (Rindi et al., 2007). Diese TNM-Klassifikationen befinden sich z. Zt. noch in der klinischen Erprobungsphase und müssen prospektiv evaluiert werden. U. Pape konnte retrospektiv zeigen, dass die TNM Klassifikation des oberen Gastrointestinaltraktes in einem definierten Patientenkollektiv prognostischen Wert hat (Pape et al., 2008).

Klinisch lassen sich die GEP-NETs in funktionelle und nicht-funktionelle Tumore einteilen: Bis zu 50% der GEP-NETs setzen grössere Mengen von Peptidhormonen und biogenen Aminen ins Blut frei (sie sind „funktionell wirksam“) und bewirken dadurch die für diese Tumoren charakteristischen Hypersekretionssyndrome (z.B. Zollinger-Ellison-Syndrom, Hypoglykämiesyndrom oder Karzinoid-Syndrom). Hinterdarntumore sind fast durchweg hormoninaktiv/nicht-funktionell. Das „Karzinoidsyndrom“ mit Flush, anfallsartigen Diarrhoen und Gewichtsverlust ist für Mitteldarntumore pathognomonisch. Dieses ist praktisch immer mit dem Vorhandensein von Lebermetastasen vergesellschaftet (Umgehung der hepatischen Metabolisierung der Sekretionsprodukte). Diese klinischen Symptome können im Allgemeinen durch Somatostatinanaloga oder Interferon- α gut kontrolliert werden (Faiss et al., 2003; Öberg, 2001). Bisher gibt es aber nur unzureichende medikamentöse Möglichkeiten, das Wachstum und die weitere Disseminierung von GEP-NETs zu hemmen. Dies hat auch mit den teilweise noch unverstandenen genetischen/molekularen Veränderungen der heterogenen GEP-NETs zu tun.

Eine Reihe von Studien hat gezeigt, dass GEP-NETs weder übliche gemeinsame Onkogene wie src, ras, myc, fos, noch Tumorsuppressorgene wie p53 exprimieren (O'Dowd and Gosney, 1995, Wang et al., 1997; Lee, 1996, Rindi et al., 2000). Verschiedene genetische Untersuchungen an neuroendokrinen Tumoren lassen für hochmaligne neuroendokrine Karzinome einen mit den konventionellen kolorektalen Karzinomen ähnlichen und teils gemeinsamen Transformationsweg vermuten, während die Pathogenese der niedrig-malignen GEP-NET eine grundsätzlich andere zu sein scheint. Einige Autoren sehen dies in der Abstammung der Tumorgruppen von unterschiedlichen Ursprungszellen begründet: Benigne neuroendokrine Tumoren und niedrig-maligne neuroendokrine Karzinome stammten demzufolge von orthotopen neuroendokrinen Zellen des Epithels ab nach Schädigung von teilweise differenzierten Vorläuferzellen (Mills et al., 1983; Bosman, 1997,), während der

Ursprung der hochmalignen neuroendokrinen Karzinome in einer entarteten pluripotenten Stammzelle vermutet wird (Helpap et al., 1999, Schonhoff et al 2004). Durch immunhistologische Bestimmungen der Wachstumsfraktion, sowie der neuroendokrinen Marker CgA und Synaptophysin an Tumoren diverser Organe konnte zudem gezeigt werden, dass es keine Tumorprogression von Karzinoiden über niedrigmaligne neuroendokrine Karzinome zu hochmalignen zu geben scheint (Sampietro et al., 2000; Helpap and Kollermann, 2001).

Undifferenzierte neuroendokrine Karzinome sind nahezu in der Hälfte der Fälle mit villösen Adenomen, Adenokarzinomen oder adenokarzinomatösen Elementen assoziiert, wobei Übergangszonen fehlen (Mills et al., 1983; Chen, 1989; Fenoglio-Preiser, 2001; Brenner et al., 2004). Genetische Untersuchungen von synchron aufgetretenen kleinzelligen neuroendokrinen Karzinomen und assoziierten Adenokarzinomen oder tubulovillösen Adenomen im Kolorektum zeigten identische genetische Alterationen in beiden Tumorkomponenten: ein Verlust der Heterozygotie (LOH) für p53 (Ubiali et al., 2001; Dacic et al., 2002), DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma) und APC-Tumor-Suppressorgene (Vortmeyer et al., 1997; Huang et al., 2002), bcl 2 (Latulippe and Klimstra, 2001) und den Rb-Genlocus (Huang et al., 2002), sowie eine kras-Mutation (Huang et al., 2002). Keine dieser Abnormalitäten ließ sich bei gut differenzierten neuroendokrinen Tumoren nachweisen (Vortmeyer et al., 1997).

Offensichtlich liegen also der Entstehung von hochmalignen neuroendokrinen Karzinomen und wenig differenzierten Adenokarzinomen z.T. die gleichen Veränderungen der Adenom-Karzinom-Sequenz zugrunde. Außerdem ist eine Abstammung von derselben Stammzelle anzunehmen. Welche Signalwege aber angeschaltet sein müssen, um zum einen oder anderen „Krebs-Phänotyp“ zu gelangen, ist bisher nicht geklärt. Bis dato gibt es – rein klinisch - auch keine verlässlichen prognostischen Marker zur Vorhersage des Überlebens oder des Therapieerfolgs verfügbar.

Dennoch hat es in den letzten Jahren natürlich Entwicklungen insbesondere in der Therapie von GEP-NETs gegeben, die nicht unerwähnt bleiben sollen. Die Chemotherapie spielt bei den schnell proliferierenden, entdifferenzierten neuroendokrinen Karzinomen (WHO Klasse III oder G3) die einzige entscheidende Rolle. Hier kommen unverändert vor allem Kombinationen aus einem Platinpräparat (Cisplatin oder neuerdings vermehrt Carboplatin) mit Etoposid zum Einsatz (Mitry and Rougier, 2001; Eriksson et al., 2009). Diese Tumoren sprechen in der Regel gut auf die initiale Chemotherapie an, rezidivieren aber schnell und häufig und werden als Zweitlinientherapie behandelt wie die kleinzelligen Lungenkarzinome.

Aufgrund der immer noch ausgesprochen schlechten Prognose ist hier die Entwicklung neuer Therapiestrategien von herausragender Bedeutung. Von den gut differenzierten neuroendokrinen Karzinomen sprechen nur die NETs des Vorderdarms (Lunge, Magen, Duodenum, Pankreas) auf eine Polychemotherapie an, hierzu werden auf Streptozotozin basierende Kombinationen mit Doxorubicin oder 5-Fluorouracil eingesetzt (Kouvaraki et al., 2004; Eriksson et al., 2009). Das Ansprechen auf eine Chemotherapie bei diesen Tumoren liegt bei max. 50 Prozent. Rektumkarzinome sind ebenfalls eingeschränkt empfindlich für eine Chemotherapie, während die häufigen Dünndarm-NETs nur ein Ansprechen von weniger als 20 Prozent zeigen, weshalb eine Chemotherapie für diese Tumorentität nicht empfohlen wird. Hier wird von der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) bei Expression von Somatostatinrezeptoren und Funktionalität des Dünndarm-NET eine Biotherapie mit Somatostatin-Analoga empfohlen. Bei nicht-funktionellen Dünndarm-NETs war die Datenlage bisher widersprüchlich, weil die antiproliferative Wirkung von Somatostatin-Analoga nur durch nicht-kontrollierte Studien vermutet wurde. Erst in diesem Jahr konnte mit einer Verdoppelung des progressionsfreien Überlebens im Vergleich zum Placebo-Arm aufgrund der Ergebnisse der prospektiven, randomisierten Multizenterstudie „Promid“ eine antiproliferative Wirkung von Somatostatin-Analoga belegt werden (Rinke et al., 2009). Die derzeit verfügbaren Somatostatin-Analoga binden vor allem an den Somatostatinrezeptor 2 (SSR2) und weniger stark an den SSR5 und SSR3. Ein in Prüfung befindliches Somatostatin-Analogon SOM230 (Pasireotide) bindet an vier der fünf SSRs und kann damit eine stärkere Wirkung bei funktionellen Syndromen entfalten als die konventionellen Somatostatin-Analoga. Eine Prüfung der antiproliferativen Aktivität von SOM230 bei NETs steht noch aus. Eine Kombination der Somatostatin-Analoga mit Interferon bringt für die meisten Patienten keinen zusätzlichen Nutzen, so daß diese Kombination zunehmend seltener eingesetzt wird. Die Expression von Somatostatinrezeptoren durch NETs ist auch Grundlage der Peptidrezeptor-vermittelten Radionuklidtherapie (PRRT). Bei diesem Verfahren wird über einen Chelator (=DOTA) ein Betastrahlen emittierendes Therapienuklid an ein Somatostatin-Analogon gebunden (Octreotate=DOTA-TATE oder Tyrosin-Octreotid =DOTA-TOC). Je nach Tumor/Metastasengröße wird ⁹⁰Yttrium (Betastrahler mit einer Reichweite von ca. 12 mm im Gewebe, präferentiell für größere Tumore) oder ¹⁷⁷Lutetium (Betastrahler mit niedriger Reichweite von ca. 2 mm, häufig für kleinere Tumore) als Therapienuklide eingesetzt. Beide Radiopharmaka können auch mit Erfolg sequentiell verwendet werden. Aufgrund der potentiellen renalen und hämatologischen Toxizität ist es wichtig, die Patientengruppen genau zu definieren, die mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Therapie

profitieren. Die klinische Wirksamkeit der Radio-Rezeptortherapie konnte in großen Studien belegt werden (Kwekkeboom et al., 2008). Ein primärer Progredienz unter PRRT tritt bei weniger als 15 Prozent der Patienten auf und ist mit einer sehr schlechten Prognose verbunden. Wenn die Patienten auf die Therapie ansprechen, ist die Zeit bis zur nächsten Progression im Median 40 Monate und das Überleben im Median mehr als 48 Monate. Am besten sprechen pankreatische NETs – insbesondere Glukagonome und Gastrinome - sowie Midgut-NETs auf eine PRRT an. Interessanterweise ist die Wirksamkeit der Radio-Rezeptortherapie nicht eindeutig abhängig von der Proliferationsrate, sofern eine hohe Somatostatin-Rezeptor-Expression vorliegt. Damit stellt die PRRT bei geeigneten Patienten die derzeit wirksamste palliative Tumorthherapie dar, ist allerdings einschränkend nur an wenigen Zentren in Deutschland verfügbar. Eine gezielte Therapie der NETs durch molekular definierte Wirkstoffe wäre analog der Therapie der chronischen myeloischen Leukämie oder den gastrointestinalen Stromatumoren eine wünschenswerte Option. Der Nachweis einer Aktivierung des mTOR-Signalweges und der VEGF-Rezeptoren in den GEP-NETs bietet die Basis für eine Therapie mit RAD001 als mTOR-Inhibitor und Sunitinib als VEGF-Inhibitor, der auch andere potentiell aktivierte Tyrosinkinasen inhibieren kann. Für beide Substanzen liegen erfolgreich durchgeführte Phase-II-Studien vor, die randomisierten Phase III Studien sind in der Auswertung. Diese hier vorgestellten Substanzen werden vor allem für vielfach vorbehandelte Patienten geeignet sein, da diese ein niedriges Nebenwirkungsprofil aufweisen. Bei allen therapeutischen Überlegungen muss noch einmal betont werden, dass zumindest im Fall der gut differenzierten neuroendokrinen Karzinome, im Gegensatz zu den üblichen „standardisierten“ Vorgehensweisen, z. B. in der onkologischen Therapie häufiger solider Tumore, ein anderes Procedere erforderlich ist, da der Krankheitsverlauf sich über Jahre bis Jahrzehnte, oft mit wenig Einschränkungen in der Belastbarkeit, hinziehen kann und häufig multiple verschiedene Therapiemodalitäten abgestuft erforderlich sind, um die Tumorlast zu begrenzen. Dieses Vorgehen erfordert eine hohe Individualisierung der Therapie einerseits und umfangreiche Erfahrung von seiten der behandelnden Ärzte andererseits (Abstimmung des Procedere im interdisziplinären Tumorkonsil). Andererseits ist der Zeitpunkt, zu dem der Tumor anfängt, schneller zu wachsen oder sich „aggressiver“ zu verhalten, mit den heutigen Methoden nicht vorhersehbar und die molekularen Grundlagen noch unverstanden. Auch hier wären also prognostische und oder prädiktive Marker von großem Interesse.

1.2 „Targets“ – Angriffspunkte zielgerichteter Krebstherapien

1.2.1 Apoptose und Zellzyklus

Die Regulation von Zellproliferation und Zelltod erfolgt durch eng miteinander verknüpfte Signalwege. Im normalen und ausgereiften, adulten, sich aber dennoch ständig selbst erneuernden Gewebe besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellproliferation durch mitotische Teilung und Zelluntergang durch programmierten Zelltod (Kerr et al., 1972; Meier et al., 2000; Evan and Vousden, 2001). Beide Phänomene werden durch komplizierte Regulationsvorgänge engmaschig kontrolliert (Daniel, 2000). Diese beiden Phänomene spielen, wenn sie dysreguliert sind, bei der Entstehung von Tumoren eine entscheidende Rolle: Neben einer gestörten Apoptoseregulation ist die unkontrollierte Zellteilung ein Charakteristikum von Tumorzellen. Die ungehemmte Aktivierung von Zellzyklus-aktivierenden Signalwegen erleichtert die Tumorentstehung, ebenso wie die Inaktivierung von Signalwegen, die den Zelltod auslösen (Wyllie et al., 1999). Alle malignen Tumoren weisen solche Störungen der Proliferations- und der Zelltodkontrolle auf. Maligne Tumoren sind häufig genetisch instabil und akkumulieren nach den initialen transformierenden genetischen Ereignissen weitere sekundäre genetische Veränderungen (Hoeijmakers, 2001). Dies kann zu einem weiteren Verlust der Proliferationskontrolle und noch stärkerer Apoptoseresistenz führen. Solche Veränderungen werden im Rahmen der Tumorprogression beobachtet, also bei der Entstehung aggressiverer und therapieresistenter Tumore, z.B. als Folge einer Chemo- oder Strahlentherapie. Eine Übersicht über die verschiedenen Regulatoren des Zellzyklus und der Apoptose findet sich bei (Daniel, 2003).

1.2.1.1 Zellzyklusregulation

Zellwachstum entsteht durch Progression der Zelle durch den Zellzyklus (Gillett and Barnes, 1998), der sich aus vier definierten, voneinander abgrenzbaren Phasen zusammensetzt: G₁, S, G₂ und M-Phase. Das Fortschreiten einer Zelle aus der G₀-Ruhe-Phase in die G₁-Phase des Zellzyklus und aus der G₁-Phase in die S-Phase wird durch den G₁-Restriktionspunkt in der späten G₁-Phase reguliert (Sherr and Roberts, 1999). Ist dieser Kontrollmechanismus in Tumorzellen durch ein Proliferationssignal aufgehoben, z.B. durch genetische Defekte in Kontrollgenen, geht die Zelle in die S-Phase über und beginnt mit der DNA-Synthese. Wachstumshemmende Signale können das Fortschreiten proliferierender Zellen im Zyklus in jeder Phase des Zellzyklus verhindern. Das wesentliche Zielgen dieser wachstumshemmenden Signale sind Mitglieder der Retinoblastom (Rb-) Proteinfamilie. Die wachstumkontrollierende

Funktion der Rb-Proteine beruht auf ihrer Fähigkeit, reversibel an Transkriptionsfaktoren, z.B. E2F (Johnson and Walker, 1999) oder c-myc, zu binden. Dabei hemmt es ebenfalls umgebende Transkriptionsfaktoren und blockiert hierdurch die Transkriptionsmaschinerie für das betroffene Gen, z.B. Zellzyklus-fördernder Gene. Dadurch wird die Zelle im Zellzyklus (in dem Fall G1-Phase) arretiert. Die Bindung von Rb an E2F wird durch den Phosphorylierungsstatus von Rb reguliert (Kaelin, Jr., 1999; Tamrakar et al., 2000). Wenn Rb hypophosphoryliert ist, inhibiert Rb die o.g. Transkriptionsfaktoren und verhindert dadurch die Hochregulation von Genen, die für das Fortschreiten im Zellzyklus verantwortlich sind. *Vice versa* muss Rb phosphoryliert und somit funktionell inaktiviert sein, damit der Zellzyklus voranschreiten kann. Die Herunterregulation der Cyclin B Spiegel am Ende der G2- und zu Beginn der M-Phase führt letztlich zur Hypophosphorylierung von Rb und ermöglicht somit das Ende des Zellzyklus nach Abschluss der Mitose.

1.2.1.1.1 Cykline und deren Inhibitoren

Der Übergang von einer in die nächste Phase des Zellzyklus wird durch cyclinabhängige Kinasen (CDK) reguliert. Diese Enzyme bilden einen Komplex mit jeweils spezifischen Kofaktoren, den Cyklinen. Diese aktiven Cyklin-CDK-Komplexe phosphorylieren Substratproteine wie z.B. das schon erwähnte Rb. Cyklin-CDK-Komplexe regulieren dadurch die entscheidenden Kontrollpunkte des Zellzyklus. Die Cycline vom D-Typ (Cyklin D1, D2, D3) kontrollieren gemeinsam mit Cyclin E die Aktivität von Rb am G1 Restriktionspunkt (Keyomarsi and Herliczek, 1997; Vidal and Koff, 2000). Rb wird durch diese D-Cycline und die assoziierten Kinasen CDK4 und CDK 6 phosphoryliert, wodurch es zur Hochregulation von Cyclin E kommt. Der Komplex aus Cyclin E und der CDK2 Kinase vermittelt einen zweiten Rb-Phosphorylierungsschritt in der späten G1-Phase.

Neben der phasenspezifischen Expression der Cycline, die das koordinierte Durchschreiten des Zellzyklus nach Proliferationssignalen steuern, kann der Zellzyklus durch spezifische Inhibitoren von CDKs gehemmt werden. Diese Inhibitoren werden als CDKI's (Cyclin-dependent kinase inhibitors) bezeichnet. Bisher konnten zwei Unterfamilien der CDKIs identifiziert werden: 1) die CIP/KIP Familie (p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}), die multiple verschiedene Cyclin/CDK Komplexe auch in der G2/S-Phase hemmen können und 2) die INK4-Familie (p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p14^{INK4d}), die spezifisch CDK4 und CDK6 hemmen (Roussel, 1999). Diese CDKI werden u.a. durch nukleäre Stresssignale, z.B. nach DNA-Schädigung in Folge von Bestrahlung oder Chemotherapie, aktiviert. Die Aktivität von

CDK2 (assoziiert mit Cyclin E) kann durch CIP/KIP CDKI Proteine gehemmt werden. Die INK4-Familienmitglieder verhindern die Progression aus der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus, indem sie die Phosphorylierung von pRb verhindern. Dies erfolgt durch Hemmung der Cyclin D-abhängigen CDK4 und CDK6. Das somit hypophosphorylierte Rb hemmt wiederum die Aktivität von Transkriptionsfaktoren (z.B. E2F) und verhindert dadurch die Expression von Cyclin E und weiteren für die S-Phase-Progression benötigten Faktoren. Dies erklärt auch, warum INK4-CDKI für ihre Wirkung Rb benötigen.

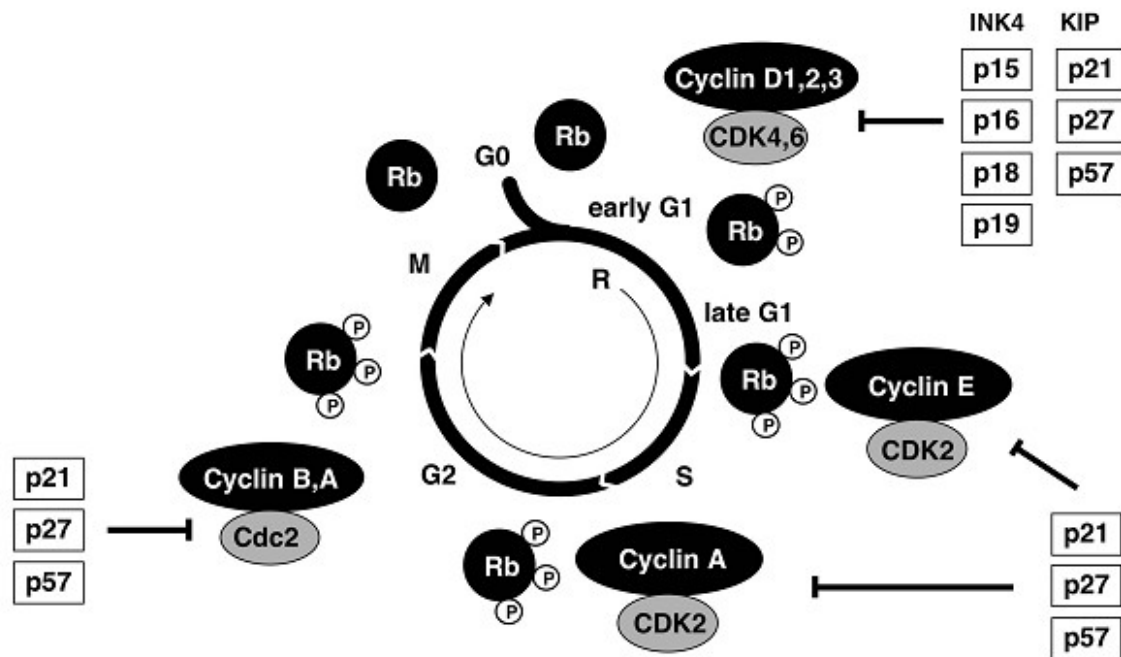


Abbildung 1: Zellzyklus

1.2.1.2 Apoptoseregulation

1.2.1.2.1 p53

DNA-Schädigung durch Chemotherapeutika oder ionisierende Strahlung aktiviert eine physiologische nukleäre Stressantwort, die in den Tumorzellen transienten Zellzyklus-arrest, zumeist in der G1- und der G2-Phase, induziert, wodurch der Zelle die Reparatur ermöglicht wird. Hier sind verschiedene, in Abb. 2 dargestellten Regulatoren notwendig (z.B. p53, p21^{Cip/Waf-1}, p16^{INK4a}, p14^{ARF}). Bei schwerer Schädigung geht die Zelle statt in einen transienten in einen permanenten Arrest (prämaturre Seneszenz). Die Inaktivierung der Kontrollgene resultiert in der Unfähigkeit der Tumorzelle, nach DNA-Schädigung im Zellzyklus zu arretieren. Hierdurch kommt es (im Tiermodell) zu rascher Reaktivierung des Tumorzellwachstums nach Therapie (Lee and Schmitt, 2003).

Schlägt die Reparatur therapieinduzierter Schäden fehl, und sind die Seneszenzprogramme der Tumorzelle defekt, werden Zelltodsignale aktiviert. Auch hier nimmt p53 eine zentrale Rolle ein (Vousden and Lu, 2002), indem es eine Vielzahl von Zelltodgenen induziert: Hierzu gehören im wesentlichen Schlüsselgene des mitochondrialen Apoptose-Signalweges, insbesondere pro-apoptotische Mitglieder der bcl-2 Genfamilie (Bax, Bak, verschiedene BH3-only Proteine, z.B. Puma, Noxa, Nbk/Bik (Oda et al., 2000)), das Adapterprotein APAF-1, sowie eine Reihe weiterer Effektorgene mit teils noch unbekannter Funktion. Es kann aber auch als transkriptioneller Repressor dienen und Expression anderer Gene direkt oder indirekt reprimieren (z.B. bcl-2, cdc2, Cyclin B, (Taylor and Stark, 2001)). Komponenten des Todesrezeptorsignalweges scheinen nicht wesentlich zur Apoptose-Auslösung in Tumorzellen nach Bestrahlung oder Chemotherapie beizutragen (Wieder et al., 2001; Von Haefen et al., 2003). Zu den p53- Zielgenen im Zellzyklus- und DNA-Reparatur-Signalweg gehören p21Waf/Cip1, 14-3-3-sigma, Gadd45 und MSH2. Es gibt eine Vielzahl positiver und negativer Rückkopplungs-Schleifen, über die Proteinexpression und Aktivität des p53-Gens reguliert werden (Harris and Levine, 2005). Auch ist inzwischen bekannt, dass es neben seiner Aktivität als Transkriptionsfaktor eine direkte, transkriptionsunabhängige Apoptose-vermittelnde Aktivität des p53-Proteins gibt (Schuler and Green, 2005). Komponenten des p53-Signalweges sind in jedem Fall wichtige und zentrale Zielstrukturen für neue Therapie-Modalitäten ((Slee et al., 2004; Vousden and Prives, 2005; Selivanova, 2004)). Das p53-Gen selbst ist in vielen menschlichen Tumoren mutiert, die Frequenz der Mutation hängt ab von der Tumorart. Bei über 50% der menschlichen malignen Tumoren konnte eine Mutation oder ein Verlust von p53 nachgewiesen werden (Hollstein et al., 1994). Dieses geht mit einer Inaktivierung der damit verbundenen Signalwege einher. Ziel neuer Therapieansätze ist es daher, Signaldefekte in Tumoren speziell zu attackieren, oder niedermolekulare pharmakologische Substanzen zu entwickeln, die mit Zelltodsignalwegen interagieren. Im Fall von p53 ist z.B. ein Ansatz, mutiertes und hierdurch missgefaltetes p53-Protein in eine funktionelle Form zurückzufalten (Foster et al., 1999). Ein ähnliches Ziel verfolgt der gentherapeutische Ansatz, mit Hilfe viraler Gentherapievektoren Gene wie z.B. p16, p53 oder p14ARF in Tumorzellen einzuschleusen, um diese im Wachstum zu hemmen bzw. in die Apoptose zu treiben (Hemmati et al., 2002).

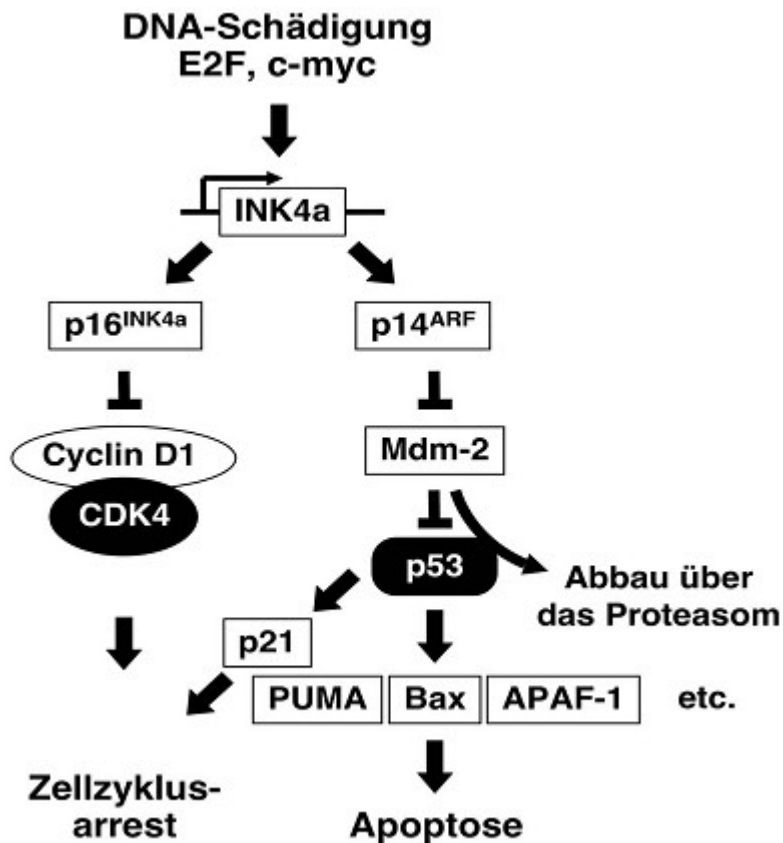


Abb. 2: Signaltransduktion nukleärer Stresssignalwege

Nukleäre Stresssignale, z.B. in Folge DNA-Schädigung oder Aktivierung von Onkogenen, aktivieren den p53 Signalweg. P53 wirkt als transkriptioneller Aktivator von Zellzyklusarrest- bzw. Apoptose-Genen.

1.2.1.2.2 Inhibitor-of Apoptosis-Familie: Survivin

Survivin wurde 1997 von Ambrosini als Mitglied der sogenannten IAP-(inhibitor-of-apoptosis) Familie identifiziert und charakterisiert (Ambrosini et al., 1997). Das menschliche Survivin-Gen umfasst 14,7 kb an der Telomerposition des Chromosoms 17 und ist lokalisiert auf q25 (Li et al., 1998). Es hat drei Introns und vier Exons, einen TAT-losen proximalen Promoter und ca. 200 GC-reiche Regionen stromaufwärts von Exon 1 (Ambrosini et al., 1997). Das Survivin-Gen kodiert für ein 16,5 KD Protein mit 142 Aminosäuren. Als Mitglied der IAP-Familie besitzt es eine einzige Baculovirus-IAP-repeat (BIR)-Domäne und eine verlängerte COOH-terminale alpha-helikale coiled-coil Region (LaCasse et al., 1998). Eine RING-Finger-Domäne wie die anderen Mitglieder der IAP-Familie besitzt es nicht. Von Survivin existieren mehrere Spleißvarianten, denen unterschiedliche Funktionen zugeschrieben werden (Mahotka et al., 1999; Badran et al., 2004; Caldas et al., 2005). Offensichtlich wirken diese Spleißvarianten wie „intrinsische Gegenspieler“ des „full-length-Proteins“ Survivin; z.B. scheint die Spleißvariante Survivin 2B seine antiapoptotische

Funktion vollständig verloren zu haben. Bei Magen- und Nierenkarzinomen tritt mit fortgeschrittenem Stadium ein Verlust von Survivin 2B auf (Krieg et al., 2002; Mahotka et al., 2002a).

Survivin wird zellzyklusabhängig reguliert, wobei die Expression in der G2/M-Phase deutlich zunimmt (Li et al., 1999). In dieser Zellzyklusphase assoziiert Survivin mit dem Komplex CDK/Cyclin B1 und wird phosphoryliert (O'Connor et al., 2000a). Survivin kann in zwei Zellkompartimenten immunhistochemisch nachgewiesen werden. Der nukleäre Pool ist mit dem Kinetosom der Metaphase-Chromosomen und der zentralen Spindel in der Anaphase assoziiert. Der zytoplasmatische Pool assoziiert in der Interphase mit Mikrotubuli, Zentrosomen, Spindelpolen und der mitotischen Spindel, in der Metaphase und Anaphase mit den Mikrotubuli. Komplette Survivin-Defizienz führt an der knockout-Maus zu einer hundertprozentigen embryonalen Letalität durch einen katastrophalen mitotischen Defekt und ein komplettes Fehlen der mitotischen Spindel (Uren et al., 2000). Allerdings führt die Abwesenheit von Survivin in euploiden menschlichen Zellen zwar zu Defekten in der Zellteilung durch Fehlen der Spindel-midzone und der Mikrotubuli in der späten Mitose, aber die Zellen sterben nicht (Yang et al., 2004). Zusätzlich gibt es Hinweise, dass Survivin auch an der Regulation der Chromosomen-Segregation beteiligt ist (Kallio et al., 2001), und dort zusammen mit den „chromosomalen Passenger Proteinen“ Aurora B und INCENP wirkt (Carvalho et al., 2003). Seit kurzem ist auch ein mitochondrialer Pool von Survivin bekannt, der zusammen mit dem zytosolischen Pool durch Interaktion mit den Caspasen 3, 7 und 9 eine antiapoptotische Funktion erfüllt (Li and Ling, 2006).

Da Survivin in embryonalen und fötalen Gewebe sehr stark exprimiert wird, nicht aber in differenziertem ausgereiftem Gewebe, mit Ausnahme proliferierender Zellen (Thymus, Endothelzellen, neuronale Stammzellen (O'Connor et al., 2000b), basales Kolonepithel (Gianani et al., 2001)), in Tumorgewebe hingegen sehr stark überexprimiert wird, ist Survivin ein interessanter „Kandidat“ für eine tumorspezifische Therapie. Außerdem wird Survivin bei einer Vielfalt von prämaligen Läsionen exprimiert, z.B. in Kolonpolypen (Gianani et al., 2001), und M. Bowen (Altieri, 2003), was darauf hindeutet, dass die Re-Expression von Survivin sehr früh während der malignen Transformation auftritt. Bei einigen Tumorentitäten kennt man die molekularen Mechanismen, die zur Hochregulation von Survivin führen. So ist bei Neuroblastomen ein Zuwachs des Chromosomen-Bereichs 17q25, auf dem auch Survivin liegt, ein häufiges Ereignis (Plantaz et al., 1997); bei Ovarialkarzinomen wird das Exon 1 von Survivin demethyliert und somit transkriptionell aktiviert (Hattori et al., 2001). Die prognostische Bedeutung von Survivin wurde bei verschiedenen Tumorentitäten untersucht

(z.B: (Tanaka et al., 2000; Shinohara et al., 2005; Kawasaki et al., 1998) und in einigen dieser Studien die Korrelation einer hohen Survivin-Expression mit einem schlechteren Überleben gefunden. Ein Mechanismus hierfür könnte die mit Survivin in Verbindung gebrachte Chemo- bzw. Strahlenresistenz von Tumoren sein (Li et al., 1998). Eine Inhibition der Survivinexpression kann Tumorzellen erneut sensibilisieren (Wang et al., 2003). In einer klinischen Studie an fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen, die mit Taxol/Cisplatin behandelt wurden, wurden deutlich höhere klinische und pathologische Ansprechraten erzielt, wenn Survivin nicht oder wenig exprimiert wurde (43% versus 75%, (Zaffaroni et al., 2002)). Chemotherapie mit Cisplatin bei kleinzelligen Lungenkarzinomen verstärkt die Survivin-Expression über eine Aktivierung des PI3-Kinase-Signaltransduktionswegs (Belyanskaya et al., 2005). Derselbe Mechanismus scheint für die Resistenzentwicklung von Prostatakarzinomzellen gegen Antiandrogene ursächlich zu sein (Zhang et al., 2005). Bei anderen Chemotherapeutika ist der Zusammenhang zur Survivin-Expression noch nicht untersucht.

Die starke Survivinexpression hat auch eine Strahlentherapieresistenz zur Folge (Asanuma et al., 2000) und scheint ein Strahlen-induzierbarer Faktor zu sein (Rodel et al., 2005).

Anti-Survivin basierte Therapien haben zum Ziel, Apoptose auszulösen, das Tumorzellwachstum zu hemmen und die Tumorzellantwort auf Chemotherapie-Stimuli zu erhöhen. Verschiedene molekulare Antagonisten sind bereits im Fokus der Forschung, darunter Antisense-Oligonukleotide (Ma et al., 2005), Ribozyme ((Pennati et al., 2004b; Pennati et al., 2004a), , siRNAs (Paduano et al., 2006), dominant-negative Mutanten (Grossman et al., 2001) sowie Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen (O'Connor et al., 2002).

1.2.1.2.3 Mitochondrialer Apoptose-Signalweg: Peripherer Benzodiazepinrezeptor

Der periphere Benzodiazepinrezeptor (PBR) wurde erstmals als Bindungsstelle für Diazepam in Rattennieren nachgewiesen (Braestrup and Squires, 1977), was zu seiner Benennung führte. Der PBR unterscheidet sich jedoch sowohl in seiner Struktur als auch pharmakologisch von den zentralen Benzodiazepin-Bindungsstellen, den GABA_A-Rezeptoren (Braestrup and Squires, 1977). Außerdem wird er nicht nur von peripheren Geweben, sondern auch im Gehirn exprimiert. Der PBR ist nahezu ubiquitär in allen Geweben vorhanden, jedoch in recht unterschiedlichen Mengen. In steroidbildenden Geweben wie Ovarien, Hoden, Plazenta oder Nebenniere wird er stark exprimiert (Beurdeley-Thomas et al., 2000; Gavish et al., 1999), während er im Skelettmuskel, im Gastrointestinaltrakt und in großen Teilen des

Gehirns nur in kleinen Mengen nachweisbar ist (Verma and Snyder, 1989; Gavish et al., 1992). In Tumoren ist der PBR häufig überexprimiert. Eine erhöhte PBR-Ligandenbindung oder eine gesteigerte mRNA-Expression wurde in Karzinomen des Dickdarms, des Gehirns, der Brust, der Ovarien und der Leber gefunden (Katz et al., 1988; Cornu et al., 1992; Hardwick et al., 1999; Katz et al., 1990; Venturini et al., 1998). Eine Überexpression des PBR-Proteins wurde allerdings bisher nur bei Astrozytomen (Miettinen et al., 1995) und bei Brust- und Prostatakarzinomen (Galieque et al., 2004; Han et al., 2003; Mega et al., 2006a) gezeigt.

Der PBR ist ein 18 kD großes Protein und besteht aus 169 Aminosäuren. Er hat einen großen hydrophoben Anteil und ist positiv geladen. Dreidimensionale Modelle zeigen, dass der PBR fünf α -Helices aufweist, die die äußere Mitochondrienmembran durchspannen (Culty et al., 1999). Die Transmembrandomänen des PBR bilden eine Pore, durch die u.a. Cholesterol ins Mitochondrium transportiert werden kann. Der C-Terminus beinhaltet die Cholesterolbindungsstelle und befindet sich auf der zytoplasmatischen Seite. Der N-Terminus ragt in den Intermembranraum. Der PBR ist zumeist in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (Anholt et al., 1986) und dort mit dem Porin (VDAC, *voltage-dependent anion channel*) und dem Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT) assoziiert. Diese Proteine sind Bestandteil der *permeability transition pore* (Fennell et al., 2001), die eine wichtige Rolle bei der mitochondrienabhängigen Apoptose spielt (Veenman, 2008; Marchetti et al., 1996a; Costantini et al., 2000). Wirken apoptotische Signale wie z.B. zytotoxische Substanzen auf die Zelle, so öffnet sich die Pore, das Mitochondrium schwillt an und lösliche Faktoren wie Cytochrom C und der Apoptose-induzierende Faktor (AIF) werden freigesetzt (Zorov, 1996). Cytochrom C kann aber auch unabhängig von dem Abfall des mitochondrialen Membranpotentials freigesetzt werden und Apoptose vermitteln (Bossy-Wetzel et al., 1998). Im Zytosol aktivieren Cytochrom C und AIF Caspasen, die ihrerseits Enzyme wie Endonukleasen aktivieren, die die Apoptose-assoziierten morphologischen Veränderungen der Zelle bewirken. Eine Beteiligung von PBR an der Apoptoseregulation wurde bereits gezeigt, wobei die genauen Mechanismen noch nicht bekannt sind. Dem PBR-Protein selbst wird eine Apoptose-protective Funktion zugeschrieben. Die PBR-Transfektion in Jurkat-Zellen führt zu einem Schutz vor UV-induzierter Apoptose (Stoebner et al., 2001). Diese protective Wirkung des PBR kann durch PBR-spezifische exogene Liganden antagonisiert werden. Die synthetischen Liganden PK 11195, FGIN-1-27 und das Benzodiazepin Ro5-4864 weisen eine hohe Affinität zum PBR auf, können jedoch an zentrale Benzodiazepin-Bindungsstellen kaum binden (Kozikowski et al., 1993). Im Gegensatz dazu bindet

Clonazepam nur an zentrale Bindungsstellen (Wang et al., 1984). Für die PBR-spezifischen Liganden wurde gezeigt, dass sie in verschiedenen Tumorentitäten antiproliferative Wirkung erzielen. So wurde bereits gezeigt, dass spezifische PBR-Liganden die Induktion von Apoptose durch verschiedene antineoplastische Wirkstoffe wie Etoposid, Doxorubicin, Arsenit oder Londamin erleichtern, indem sie der zytoprotektive Wirkung von Bcl-2 entgegen wirken (Larochette et al., 1999; Ravagnan et al., 1999). Darüber hinaus wurde eine direkte Apoptose-induzierende Wirkung der PBR-spezifischen Liganden gezeigt (Fischer et al., 2001; Tanimoto et al., 1999). Proteine der Bcl-2 Familie können durch Bindung an die *permeability transition pore* das mitochondriale Membranpotential und die Freisetzung von Cytochrom C während der Apoptose regulieren (Shimizu et al., 1999). Ein funktioneller Zusammenhang zwischen Bcl-2 Proteinen und PBR wird daher diskutiert.

Neben einer gestörten Apoptoseregulation ist die unkontrollierte Zellteilung ein Charakteristikum von Tumorzellen. Spezifische PBR-Liganden können nicht nur Apoptose auslösen, darüber hinaus wurde eine Zellzyklus-arretierende Wirkung gezeigt. In Mammakarzinomzellen bewirken PBR-Liganden einen Zellzyklus-Arrest in der G0/G1-Phase und der G2/M-Phase (Carmel et al., 1999; Landau et al., 1998). Das Benzazepin BBL22, ebenfalls ein PBR-spezifischer Ligand, arretiert hämatopoetische und epitheliale Tumorzelllinien in der G2/M-Phase (Xia et al., 2000).

Basierend auf seiner Struktur sowie aufgrund der subzellulären Verteilung des PBR werden dem PBR aber auch eine Reihe von weiteren Funktionen zugeschrieben. Am besten untersucht ist seine Rolle in der Steroidsynthese. Er ist an dem Transport von Cholesterol in die Mitochondrien beteiligt, wo Cholesterol in Pregnenolon umgewandelt wird. Der Transport stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Steroid-synthese dar (Papadopoulos et al., 1997). Des Weiteren wurde eine funktionelle Bedeutung des PBR bei der Immunantwort (Torres et al., 1999), der Insulinsekretion (Marchetti et al., 1996b), der Mitochondrienatmung (Krueger, 1995), der zellulären Differenzierung (Canat et al., 1993) und bei der Zellproliferation (Beurdeley-Thomas et al., 2000) nachgewiesen. Die Überexpression von PBR bei einer Vielzahl von Tumorentitäten lässt eine wichtige Rolle des PBR bei der Tumorgenese und -progression vermuten. So wurde gezeigt, dass die PBR-Expression mit der Malignität von Gliomen korreliert (Miettinen et al., 1995). Außerdem stellt eine hohe PBR Überexpression einen negativen prognostischen Faktor bei Lymphknoten-negativen Brustkrebspatienten dar (Galiegue et al., 2004). Beim Brustkrebs scheint neben der Expression die subzelluläre Verteilung des PBR von Bedeutung zu sein. Es wurde gezeigt, dass die Aggressivität von Brustkrebszellen mit dem Ausmaß einer nukleären Lokalisation

des PBR korreliert (Hardwick et al., 1999). Die Überexpression von PBR im Tumorgewebe wurde bereits in der Diagnostik und für erste tumorspezifische Therapieansätze genutzt. Radioaktiv markierte PBR-Liganden wurden nuklearmedizinisch in der Positronenemissionstomografie verwendet, um Gliome zu lokalisieren (Junck et al., 1989) oder z.B. Mikroglia-Aktivierung bei chronisch neuroinflammatorischen Krankheiten wie Alzheimer-Krankheit, darzustellen (Dollé, 2009). Aus therapeutischer Sicht könnte sich der PBR als Zielprotein für eine tumorzellspezifische Aufnahme bzw. Retention antineoplastischer Substanzen eignen. Dieser Ansatz wurde mit einem Konjugat aus PBR-Ligand und Chemotherapeutikum in Glioblastom-Zelllinien (Musacchio, 2009) sowie einem Gliom-Xenograft-Modell verfolgt (Guo et al., 2001). Außerdem wurde der PBR als Zielprotein bei der photodynamischen Therapie beschrieben (Kessel et al., 2001; Ebert et al., 1998; Suerbaum and Michetti, 2002). Eine direkte Wirkung von den o.g. spezifischen exogenen PBR-Liganden wurde für eine Reihe von Tumorentitäten *in vitro* beschrieben. Antiproliferative Effekte der PBR-Liganden Ro5-4864 und PK 11195 in mikromolaren Konzentrationen sind z.B. bei Brustkrebs (Carmel et al., 1999), Melanomen (Landau et al., 1998), Hodenkrebs (Garnier et al., 1993) und Gehirntumoren (Pawlikowski et al., 1988; Newshan, 1998) nachgewiesen.

1.2.2 Andere Zielproteine

1.2.2.1 Sialyl Lewis^X (SialylLe^X)

Alterierte Blutgruppenantigene repräsentieren eine Familie von Carbohydrat-Epitopen, die in malignen Geweben häufig überexprimiert werden (Hanski et al., 1991) und mit einer Tumorprogression und Metastasierung in Verbindung gebracht werden (Nakayama et al., 1995). Man stellt sich hierbei vor, dass es während der malignen Transformation zu einer abnormalen Glykosylierung der Carbohydrat-Epitope kommt. SialylLe^X ist ein Tetrasaccharidrest, der auf vielen Membranglykoproteinen und -glykolipiden von epithelialen und lymphatischen Zellen präsent ist. Schon früh hat man herausgefunden, dass durch Bindung von SialylLe^X auf der Zellmembran von neutrophilen Granulozyten an von aktivierten Endothelzellen induzierbarem E-Selectin die Extravasation und Immigration ins Gewebe von Neutrophilen initiiert wird (Munro et al., 1992). E-Selectin gehört zur Familie der Zelladhäsionsmoleküle. Chemische Analysen zeigen, dass das SialylLe^X-Oligo-saccharid die minimal wichtige Struktur ist, um E-, L- und P-Selectin zu binden (Foxall et al., 1992). Dieses Antigen ist immunhistochemisch auf normalem Darmepithel nicht nachweisbar, wird aber während der Adenom-Karzinom-Sequenz graduell immer mehr exprimiert, bis es in der

Plasmamembran kolorektaler Karzinome in bis zu 90% detektiert wird. Der genaue zugrundeliegende Mechanismus ist noch nicht in allen Einzelheiten verstanden. Man postuliert aber, dass der oben beschriebene Effekt der Selectin-Bindung ein Mechanismus sein könnte, wie es zu einer hämatogenen Metastasierung kommt. Diese Adhäsion von Tumorzellen könnte der initiale Schritt bei der Tumorzelle extravasation sein.

SialylLe^X ist auch im Serum von Patienten mit Tumoren nachweisbar. Dieses wird in Japan bereits genutzt. Es konnte gezeigt werden, dass die SialylLe^X-Spiegel bei Patientinnen mit fortgeschrittenem und metastasiertem Brustkrebs deutlich höher sind (Matsuura et al., 1997). Ähnliches konnte bei Colon-Karzinomen gefunden werden (Ito et al., 2001). In denselben Studien wurden auch die E-Selectin-Blutspiegel bestimmt. Bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen korrelierte eine hohe Serum-konzentration von E-Selectin nur dann mit einer schlechten Prognose für die Patienten, wenn die Tumorzellen signifikant viel Sialyl-Le^X exprimierten. Allerdings fehlen hierzu prospektive kontrollierte Studien. Verschiedene Strategien wurden vorgeschlagen, die Selectin-vermittelte Adhäsion von Krebszellen zu blockieren, z.B. durch den Gebrauch von Antikörpern gegen SialylLe^X oder Antisense-bzw. siRNA-Strategien (Nishiwaki et al., 2003; Hiraiwa et al., 1996; Weston et al., 1999). In Zelllinienmodellen und Nacktmäusen konnten monoklonale Antikörper gegen SialylLe^X orthotope Metastasen von Pankreas- und Magenkrebs verhindern (Hosono et al., 1998; Nakashio et al., 1997). Interessanterweise haben einige „konventionelle“ pharmazeutische Substanzen wie die COX-2-Inhibitoren (Kakiuchi et al., 2002) und Cimetidin (Kobayashi et al., 2000) einen supprimierenden Effekt auf die selectin-vermittelte Tumorzelladhäsion in Tumorzelllinienmodellen.

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

1.3.1 „Der perfekte Biomarker“

Was soll ein „richtig guter Biomarker“ können ? Hier muss man zunächst unterscheiden zwischen der Früherkennung von malignen Tumoren, die in meiner Arbeit nicht im Mittelpunkt standen, und prognostischen und prädiktiven Biomarkern. Für eine Früherkennung eignen sich sicherlich am besten Marker, die leicht verfügbar sind, kein invasives Verfahren wie z.B. eine Endoskopie benötigen, und wiederholt leicht abgenommen werden können, also am ehesten Serum- (oder Urin/Stuhlproben-) basierte Biomarker, die aber eine hohe Spezifität und Sensitivität haben müssen. Bisher sind die sogenannten (prädiktiven) „Tumormarker“, die zwar recht breit eingesetzt werden, aber zum Screening eigentlich völlig ungeeignet sind, die bisher einzigen routinemässig angewendeten Serum-Marker in Früherkennungsprogrammen. Besser geeignet und in den S3- Leitlinien bereits implementiert sind im Fall der kolorektalen Karzinome die Tests auf okkultes Blut im Stuhl, wobei die Bemühungen, die Sensitivität und Spezifität dieser Tests zu erhöhen, noch nicht abgeschlossen sind. Für andere Tumorentitäten, wie z.B. das Ösophaguskarzinom oder die neuroendokrinen Tumore, existieren solche Biomarker bisher nicht. Selbst das Serum-Chromogranin A und die Bestimmung der 5-Hydroxy-indol-Essigsäure (5-HIES) im Urin sind maximal dazu geeignet, bei Verdacht auf einen neuroendokrinen Tumor diesen Verdacht zu erhärten, wobei die Werte besonders dann erhöht sein werden, wenn eine Funktionalität des Tumors wie z.B. das Karzinoid-Syndrom vorliegt. Hier wird eine Spezifität und Sensitivität für 5-HIES von 70-90% berichtet (O'Toole et al., 2009). Da die Symptomatik aber erst auftritt, wenn das biogene Amin Serotonin nicht mehr abgebaut werden kann, sprich, wenn Lebermetastasen vorliegen, kann man in diesem Fall von „Früherkennung“ auch nicht mehr sprechen. Im weiteren Verlauf werden Chromogranin A und 5-HIES routinemässig im „Nachsorgeprogramm“ bzw unter der (Bio-)Therapie bestimmt, dies ist ähnlich wie bei anderen Tumormarkern, z.B. CEA, die ihren Stellenwert eher als „Verlaufs-Marker“ haben (s.u.), nämlich ob eine bestimmte Therapie noch anspricht, oder ob sich im therapiefreien Intervall erneut Tumorzellen gebildet haben.

Ist der Tumorpatient erst einmal identifiziert und der Tumor histologisch gesichert, muss der Prognose-Biomarker eine Aussage über das zu erwartende biologische Verhalten des Tumors treffen und der prädiktive Biomarker eine Aussage über die zu erwartende Wirksamkeit der Therapie. In meiner Arbeit habe ich mich auf mögliche Prognose-Marker fokussiert.

1.3.2 Welche Nachweismethode ist geeignet ?

In meiner Arbeit habe ich mir die Frage gestellt, welche Methode am geeignetsten ist, um möglichst frühzeitig, also bereits bei Diagnosestellung, valide Aussagen über das weitere biologische Verhalten des Tumors zu erhalten. Grundsätzlich gibt es da natürlich verschiedene Möglichkeiten. Biochemische Verfahren eignen sich besonders zur Bestimmung von z.B. Enzym- oder Bindungsaktivitäten, sind aber oft nicht sensitiv genug, benötigen große Probenvolumina und erfassen die biologische Heterogenität des Tumors nicht ausreichend. „Genomics“, also das Screening nach Gen-Auffälligkeiten, z.B. nach Mutationen im Tumor oder auch im Vergleich zum Normalgewebe, ist natürlich eine sehr elegante Methode, kann auch an kleinen Probenvolumina eingesetzt werden, hat aber den Nachteil, dass es extrem kostenintensiv ist und einen hohen technischen Aufwand erfordert. Die Tumorerogenität ist ebenfalls nur eingeschränkt beurteilbar. „Proteomics“, also das Pendant auf Proteinebene, erfasst auch posttranslationelle Veränderungen und eignet sich auch zur Untersuchung von z.B. Serum oder Körpersekreten. Diese Methode ist aber noch in der Entwicklung und ebenfalls personell und technisch sehr aufwändig. Die immunhistochemische Untersuchung des Tumorgewebes ist dagegen eine relativ preiswerte, überall verfügbare Methode, die im Verhältnis nur wenig Personal erfordert und sich auch für den Nachweis von Heterogenitäten im Tumor, sei es jetzt Primärtumor, Metastase oder Rezidiv, eignet. Die Sensitivität ist in der Regel ausreichend, allerdings hat man zum Teil mit einer zu niedrigen Spezifität zu kämpfen. Zudem kommt, dass die Immunhistochemie auch störanfällig ist: In verschiedenen Reihenuntersuchungen fanden sich je nach Vorbehandlung der Paraffinschnitte, Lagerungsalter, Methode der Einbettung und weiterer Verarbeitung ganz unterschiedliche Ergebnisse in der Auswertung trotz Verwendung des gleichen Antikörpers, exemplarisch sei hier die Färbung für HER-2 neu genannt (Sauter et al, 2009). Allerdings scheint insbesondere beim Nachweis der EGFR-Überexpression die Immunhistologie sowieso eher ungenügend zu sein, hier hat sich die in-situ-Hybridisierungsmethode (FISH) zur Detektion der Genamplifikation als geeigneter erwiesen. Weiterhin ergibt sich das Problem der schwierigen Standardisierung bei Subjektivität der Auswertung und einer stark begrenzten quantitativen Aussage. Dennoch habe ich für meine Arbeiten die immunhistochemische Untersuchungsmethode wegen der oben genannten Vorzüge ausgewählt.

1.3.3 Interessante Patientenkollektive

Die Rationale für die verschiedenen zu untersuchenden Tumorentitäten ergab sich zum einen aus der Epidemiologie:

Kolorektale Karzinome sind nun einmal die häufigsten gastrointestinalen Tumore und werden dementsprechend häufig operiert. Hier konnten wir auf eine ausreichende Anzahl an Patienten und Tumorblöcken aus der eigenen Chirurgischen Klinik zurückgreifen, womit auch die standardisierte Operationstechnik im vorgegeben Zeitraum gegeben war. Wir haben mit Absicht die Jahre 1989-1991 ausgewählt, weil erst nach dieser Zeit im adjuvanten Setting (also UICC III) die erste, wirklich nachgewiesene wirksame Chemotherapie von Moertel und Kollegen (Moertel et al., 1990) standardisiert und dann auch routinemässig eingesetzt wurde. Dies gab mir die Möglichkeit, ein vergleichbares Kollektiv untersuchen zu können - gerade wenn es um Prognosemarker geht, wären unterschiedliche Therapieformen nicht von Vorteil. Bei diesem Kollektiv konnte man davon ausgehen und es hat sich mit Studium der Krankenakten auch bestätigt, dass nur eine Minderheit von Patienten zusätzlich zur Operation eine begleitende – damals experimentelle - Chemotherapie bekommen hat, z.B. mit Mitomycin in geringer Zykluszahl.

Ösophaguskarzinome, in dem Fall die Plattenepithelkarzinome, haben uns interessiert, weil ihre 5-Jahresüberlebensrate mit insgesamt 20% schlecht ist und es bisher sehr wenig Möglichkeiten gibt, innerhalb des Gesamtkollektivs eine Risiko-Stratifizierung durchzuführen. Hier wären sinnvolle Prognosemarker von großer Bedeutung, zumal der entsprechende chirurgische Eingriff (transthorakale en-bloc Ösophagektomie mit ein- oder zweizeitiger Rekonstruktion, Zwei-Höhlen-Eingriff) mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden ist und aufgrund der hohen Ko-Morbidität nicht einmal bei allen Patienten durchführbar ist. Auch hier haben wir auf ein einheitliches Patientenkollektiv („single-center“) zurückgreifen können.

Die **neuroendokrinen Tumore** schließlich sind aufgrund ihres unterschiedlichen Wachstumsverhaltens extrem interessant. Hier sind die therapeutischen Möglichkeiten bis in die letzten Jahre hinein sehr begrenzt gewesen. Diese Tumoren sind allerdings so selten, dass ich die Kooperation mit der großen Klinik in Marburg (Leiter: Prof. Dr. Arnold) und mit dem Uni-Klinikum Freiburg (Leiter: Prof. Dr. Blum) zu schätzen wusste. Mit gemeinsamer Anstrengung haben wir die Tumore von 89 Patienten untersuchen können, für diese Tumorentität eine recht hohe Anzahl.

1.3.4 Ziel-Proteine

Aus vielen wissenschaftlichen Untersuchungen weiss man, dass Tumorentstehung ein multifaktorieller Prozess ist, der letztlich auf einem Ungleichgewicht aus Wachstum (Proliferation) und Zelltod (programmierter Zelltod: Apoptose) beruht. Die beteiligten Signalwege sind sehr komplex, aber es gibt „zentrale Schaltstellen“ der Zellzyklus-regulation und der Apoptose, die über die verschiedenen Tumorentitäten hinweg von Bedeutung sind. Eine solche Schaltstelle bzgl. der Apoptose ist z.B. das pro-apoptotische BAX-Protein und sein Effektor p53. Die Cykline (z.B. Cyclin E) und ihre Inhibitoren der INK- (z.B. p16) und der CIP-Familie (z.B. p21, p27) sind essentiell an der Zellzyklusregulation beteiligt. Sialyl-LeX ist ein Blutgruppenantigen, das mit Tumorprogression und Metastasierung in Verbindung gebracht wird (also übertragen gesprochen bei der Progression eines Tumors vom Stadium UICC II nach UICC III und IV eine Rolle spielen könnte). Der periphere Benzodiazepinrezeptor (PBR) mit Sitz an der Mitochondrienmembran (zentral bedeutsam für den mitochondrialen Apoptosesignalweg) und Survivin als Mitglied der „inhibitor-of-Apoptosis“-Familie sind ebenfalls beides wichtige Proteine, denen eine Apoptose-Protektion (des Tumors) und eine Proliferations-förderung zugeschrieben wird. Survivin wirkt auch mitosefördernd.

Da die Sensitivität und Aussagekraft von Biomarkern durch die Kombination verschiedener Biomarker gesteigert werden kann, wollte ich weiterhin ein Modell entwickeln, das eine prognostische Aussage unter Verwendung einer „Multimarker-Analyse“ erlaubt.

Diese Proteine haben mich aber nicht nur als potentielle neue prognostische Marker interessiert. In einem zweiten Schritt möchte man, ähnlich wie es mit der Radiorezeptor-Therapie bei neuroendokrinen Tumoren möglich ist, dieselben Strukturen erst visualisieren und dann therapeutisch angreifen. Im Fall der neuroendokrinen Tumoren können die Tumore, die Somatostatin-Rezeptoren besitzen, mittels ⁶⁸Ga-DOTA-NOC-Rezeptor PET-CT detektiert und dann mit einem Betastrahler (z.B. Y90-DOTA-TOC) angegriffen werden. Im Fall von PBR gibt es bereits spezifische Liganden, die ich „von der Bedside zur Bench“ an den entsprechenden Tumorzelllinien für kolorektale und ösophageale Karzinome untersuchen und die entsprechenden Effekte messen konnte. Hier erhält man dann auch Aussagen über die beteiligten Signalwege. Andere Zielproteine wie z.B. p27 kann man durch spezifische kleine RNA-Stücke (siRNA) in seiner Funktion herunterregulieren und gleichsam als „Proof-of-Principle“ die Effekte auf Zellwachstum und Apoptose messen, dies habe exemplarisch an den GEP-NET-Tumoren untersucht.

1.3.5 Ätiopathogenese von neuroendokrinen Tumoren

Neben der praktischen Umsetzung, dem Finden von innovativen Marker-Proteinen für Diagnostik und Therapie, interessiert mich auch der Entstehungsmechanismus von Karzinomen, und hier insbesondere der neuroendokrinen Tumore. Man muss sich ja schon einmal die Frage stellen, warum sich diese Tumore so „anders“ verhalten, teils deutlich „benigner“ sind, teils aber in Tumorbiologie und Prognose den Adenokarzinomen des Kolorektums ähneln, und teils hoch-aggressiv wie die kleinzelligen Bronchialkarzinome sind. Dieser Frage habe ich mich versucht zu nähern, indem ich a) an dem zur Verfügung stehenden Tumormaterial verschiedene zentrale Zellzyklus- und Apoptose-Regulatoren untersucht habe und b) die – sehr seltenen – schlecht differenzierten neuroendokrinen Karzinome morphologisch untersucht habe (WHO Klasse III), teils auf immunhistochemischer Ebene, teils molekulargenetisch in Kooperation mit Herrn PD Dr. Arnold am Universitätsklinikum Freiburg. Obwohl wir hier einige interessante Erkenntnisse gewinnen konnten, muss ich zugeben, dass hier andere Methoden und weiterführende Untersuchungen notwendig sind.

In der Summe habe ich in meinen Arbeiten die eingangs genannten vier Ziele verfolgt:

1. prognostische relevante, neue Markerproteine für die Diagnostik gastrointestinaler Tumore zu definieren
2. diese in vitro zu modulieren und die spezifischen Effekte auf Zelllinien zu messen
3. einen Beitrag zur Charakterisierung der neuroendokrinen Tumore zu leisten um
4. neue Wege zu einer patienten-individualisierten Therapie aufzuzeigen.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Expression und prognostische Bedeutung verschiedener neuer Markerproteine bei kolorektalen Karzinomen

Das kolorektale Karzinom stellt die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache in der westlichen Welt dar (Jemal et al., 2004). Wird der Tumor in einem frühen Stadium diagnostiziert, so ist er gut operativ behandelbar. Wird ein Karzinom erst nach Befall lokaler Lymphknoten (im Stadium UICC III) erkannt, so beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate deutlich weniger, allerdings sehr unterschiedlich: 44 %-83 %. Aufgrund dieser heterogenen Überlebensraten wäre es gerade für diese Patienten wichtig, weitere prognostische Faktoren zu definieren, die eine Risikostratifizierung bezüglich eines Wiederauftretens oder Fortschreitens der Erkrankung und eine individualisierte Therapieplanung ermöglichen. In dieser Arbeit habe ich verschiedene neue Markerproteine immunhistochemisch bei einem definierten Patientenkollektiv kolorektaler Karzinome untersucht. Ich konnte z.B. zeigen, dass der PBR in 88 % der kolorektalen Karzinome im Stadium UICC III und UICC IV im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert ist. Um die Stärke der Überexpression zu bestimmen, wurde ein Färbescore entwickelt. In diesem wird sowohl der Anteil des überexprimierenden Gewebes als auch die Intensität der Überexpression berücksichtigt. 28 % der Karzinome wiesen eine starke Überexpression auf. Die starke PBR Überexpression stellte einen negativen prognostischen Faktor bei Patienten mit Karzinomen im Stadium UICC III dar. Neben PBR habe ich an demselben Patientenkollektiv weitere prognostische Faktoren wie die neuroendokrine Differenzierung, eine erhöhte Sialyl-Le^X-Expression, Mutationen im p53-Gen und eine verminderte Bax-Expression identifiziert. 20-40% aller kolorektalen Adenokarzinome weisen eine neuroendokrine Differenzierung auf (Hamada et al, 1992; Foley et al, 1998). Immunhistochemisch lassen sich die Markermoleküle Chromogranin A und Synaptophysin nachweisen, die Bestandteile verschiedener neuroendokriner Vesikeltypen sind. In dieser Arbeit konnte ich den aus der Literatur bekannten Anteil bestätigen, und nachweisen, dass Patienten mit dieser Untergruppe von Tumoren eine signifikant schlechtere Prognose haben als die Patienten mit nicht neuroendokrin differenzierten Adenokarzinomen des Kolon und Rektums. Offensichtlich bietet die neuroendokrine Differenzierung den Tumoren einen „Überlebensvorteil“, möglicherweise durch autokrine oder parakrine Sekretion von Wachstumsfaktoren, wie bereits von Johnson 1988 postuliert wurde (Johnson, 1988). In der Tat zeigen neuroendokrine Tumoren eine starke Hyper-/Neovaskularisation und damit

verbunden eine starke Expression des Angiogenesefaktors VEGF und seines Rezeptors VEGF-R (Zhang et al., 2007; Sartelet et al., 2004). Diese sind bereits „Angriffspunkt“ neuer anti-angiogenetischer Strategien wie dem anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab (Yao et al., 2008). Intakte Apoptosewege spielen eine wichtige Rolle bei der Karzinogenese und für den klinischen Verlauf von Tumorerkrankungen. In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass bei Lebermetastasen kolorektaler Karzinome der intakte p53/Bax-Signaltransduktionsweg einen positiven prognostischen Faktor darstellt (Sturm et al., 1999). Jetzt konnten wir erstmalig zeigen, dass im Stadium UICC III die Patienten mit (Primär-)tumoren mit hoher Bax-Expression eine signifikant ($p=0.009$) bessere Prognose hatten als die Patienten mit Tumoren mit niedriger Bax-Expression. Noch günstiger erwies sich die Konstellation „p53 nicht mutiert/Bax-Protein hohe Expression“. *Vice versa* konnte somit erstmals auch beim primären kolorektalen Karzinom gezeigt werden, dass ein alterierter p53/Bax-Signaltransduktionsweg mit einem signifikant schlechteren klinischen Verlauf im Stadium UICC III korreliert. Sialyl-Le^X ist ein Tetrasaccharidrest, der in der Plasmamembran kolorektaler Karzinomzellen regelmäßig detektiert wird. Er bindet an das auf Endothelzellen induzierbare E-Selectin. Diese Adhäsion könnte der initiale Schritt bei der Tumorzellextavasation sein. Schon in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß Sialyl-Le^X häufiger auf Lebermetastasen kolorektaler Karzinome nachweisbar ist als auf den Primärtumoren. In dieser Arbeit haben wir neben den Patienten mit UICC III und IV-Tumoren auch Patienten mit einem früheren Stadium, UICC II, untersucht. Der Prozentsatz von stark exprimierenden Karzinomen stieg mit fortschreitendem Tumorstadium an (UICC Stadium I 20%, II 50%, III 71%, IV 70%; $p<0.001$). Im Stadium II und III hatten Patienten mit schwach Sialyl-Le^X exprimierenden Karzinomen eine signifikant bessere Prognose. Eine starke Sialyl-Le^X-Expression erhöhte das relative Risiko am Tumor zu versterben im Stadium II 3.3 fach. Mit den ermutigenden Ergebnissen dieser retrospektiven Analyse wäre zu prüfen, ob Patienten im UICC Stadium II mit stark Sialyl-Le^X exprimierenden Karzinomen entsprechend des Protokolls für Patienten im Stadium III adjuvant chemotherapiert werden sollten.

Neben der Analyse einzelner prognostischer Marker konnte ich in dieser Arbeit aber auch zeigen, dass eine Kombination verschiedener prognostischer Marker, die verschiedene genetische Ereignisse repräsentieren und unabhängig voneinander sind, eine deutlich bessere prognostische Aussagefähigkeit besitzen als nur ein Marker alleine. Dadurch ist es möglich, Subgruppen zu definieren, die, wenn man es weiterdenkt, im Sinne einer besseren Prognose mit der „klassischen Therapie“ übertherapiert sind.

Zunächst habe ich die Kombination von neuroendokrinen Markern und dem p53/Bax-Signalweg untersucht: Die Patienten, deren Tumoren keine neuroendokrinen Marker aufwiesen, und einen intakten p53/Bax-Signalweg hatten, lebten im UICC III-Stadium deutlich länger (mittleres Überleben: 93 Monate, 82-104 Monate) – im Vergleich zu einem mittleren Überleben von 41 Monaten, wenn neuroendokrine Marker vorlagen oder der Signalweg alteriert war (26-57 Monate, $p < 0.00001$).

Im nächsten Schritt habe ich durch multifaktorielle Diskriminanzanalyse einen Algorithmus entwickelt, der die prognostische Aussagefähigkeit aller fünf oben vorgestellter Marker miteinander verrechnet. Während durch Diskriminanzanalyse nur eines Markers die Vorhersage zu 58–70 % zutreffend war, erhöhte sich die korrekte Vorhersage bei Berücksichtigung aller fünf Marker auf 77 %, wobei die Spezifität, d.h. der Anteil der Patienten, deren Überleben korrekt durch den Algorithmus vorhergesagt wird, sogar bei 83 % lag. Diese Daten zeigen, dass durch die Analyse mehrerer Marker die Überlebenschancen besser vorhergesagt werden kann, als nur bei einem Marker. Eine bessere Vorhersage ist für eine zukünftige Risiko-adaptierte Therapie essentiell.

Einschränkend muss man allerdings auch sagen, dass diese Analyse aus retrospektiven Daten gewonnen wurde und an relativ kleinen Fallgruppen getestet wurde, so dass größere prospektiv-randomisierte Studien vonnöten wären, um diese Ergebnisse zu validieren. Dennoch erscheint mir die „Multimarkeranalyse“ ein Ansatz für zukünftige, risikoadaptierte, individuelle Therapieentscheidungen zu sein.

Exemplarisch habe ich mir an einem der gefundenen Marker-Proteine die Karzinogenese genauer angeschaut. Hier lässt die häufige Überexpression des PBR in kolorektalen Karzinomen auf eine funktionelle Bedeutung des PBR in der Tumorentwicklung schließen. In früheren Arbeiten haben Bindungsstudien mit spezifischen Liganden des PBR eine 3-4 fache Überexpression bei Kolonkarzinomen im Vergleich zur gesunden Dickdarm-schleimhaut gezeigt. Die postulierte Überexpression des PBR Proteins sowie seine klinische Bedeutung, insbesondere bei kolorektalen Karzinomen, wurde jedoch noch nicht untersucht. In dieser Arbeit konnte ich nun zeigen, dass PBR schon in frühen Adenomen (kleine Adenome mit gering-gradigen Dysplasien) mit vergleichbarer Häufigkeit wie in Karzinomen hochreguliert ist. Ebenso häufig weisen Metastasen kolorektaler Karzinome eine PBR Überexpression auf. Das Ausmaß der Überexpression war in den Metastasen im Vergleich zu den Karzinomen noch erhöht. Die frühe und bis zur Metastasierung anhaltende Hochregulation des PBR lässt auf eine wichtige Rolle des PBR in der kolorektalen Karzinogenese und Metastasierung

schließen. Die häufige Überexpression und prognostische Bedeutung des PBR könnte die Grundlage für neue PBR-basierte diagnostische und therapeutische Ansätze bilden.

Die kolorektale Darmschleimhaut und die umgebenden Gewebe der meisten Metastasen exprimieren nur relativ wenig PBR. Durch spezifische Markierung des PBR könnten somit möglicherweise malignes Residualgewebe nach der Resektion bzw. Mikrometastasen detektiert werden. Radioaktiv-markierte synthetische PBR-Liganden wurden bereits bei der Positron-Emissions-Spektroskopie bei neuroinflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen erfolgreich eingesetzt (Dollé, 2009; Pappata et al., 1991; Banati et al., 2000). Darüber hinaus könnte PBR auch als Zielprotein neuer therapeutischer Ansätze dienen. Mögliche direkte wachstumshemmende Effekte spezifischer PBR Liganden werden in Kapitel 2.2 untersucht. PBR Liganden wurden aber auch schon benutzt, um Chemotherapeutika zu neoplastischem Gewebe zu dirigieren, um die Tumorspezifität von Chemotherapeutika zu erhöhen. Eine erhöhte Zytotoxizität und Spezifität durch die Kopplung an PBR Liganden wurde bereits für den Einsatz von Melphalan und Gemcitabin bei Gehirntumoren gezeigt (Kupczyk-Subotkowska et al., 1997). Ein direkter Ansatz einer PBR-basierten Therapie könnte die Modulation der PBR Expression beinhalten. PBR werden antiapoptotische und proliferative Eigenschaften zugeschrieben (siehe 1.2.1.2.2). Eine Verminderung der PBR Expression könnte zu Apoptose oder verminderter Zellteilung führen. So wurde bereits gezeigt, dass die PBR Expression durch Gingkolid B, einem Bestandteil der Blätter des Gingko Bilboa, reduziert wird. Diese Reduktion ging mit einer verminderten Zellproliferation und geringerem Gewicht von Tumor-Xenografts in Nacktmäusen einher (Papadopoulos et al., 2000).

Eigene Referenzen:

Grabowski P.*, Mann B.*, Mansmann U., Lövin N., Foss H.D., Berger G., Scherübl H., Riecken E.O., Buhr H.J., Hanski C.. Expression of sialyl-Lex antigen defined by MAb AM-3 is an independent prognostic marker in colorectal carcinoma patients. *International Journal of Cancer* 2000, 88: 281-286

Grabowski P., Schindler I., Anagnostopoulos I., Foss H.D., Riecken E.O., Mansmann U., Stein H., Berger G., Buhr H.J., Scherübl H.. Neuroendocrine differentiation is a relevant prognostic factor in stage III-IV colorectal cancer. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2001, 13: 405-411

Schelwies K., Sturm I., **Grabowski P.**, Scherübl H., Schindler I., Hermann S., Stein H., Buhr H.J., Riecken E.O., Zeitz M., Dörken B., Daniel P.T.. Low bax protein expression is a negative prognostic factor in primary colorectal cancer. *International Journal of Cancer* 2002, 99: 589-596

Maaser K. *, **Grabowski P. ***, Sutter A.P., Höpfner M., Foss H.D., Stein H., Berger G., Gavish M., Zeitz M., and Scherübl H.
Overexpression of the peripheral benzodiazepine receptor is a relevant prognostic factor in stage III colorectal cancer.
Clin. Cancer Res. 2002, 8(10):3205-3209

Grabowski P. *, Maaser K. *, Schindler I., Hanski C., Stein H., Sturm I., Hopfenmüller W., Zeitz M., Scherübl H.
Prognostic value of multimarker analysis in colorectal cancer: one step forward towards an individualized therapy decision.
Onkologie 2004, 28: 399-403

Maaser K. *, **Grabowski P. ***, Oezdem Y., Krahn A., Heine B., Stein H., Buhr H., Zeitz M., Scherübl H.
Up-regulation of the peripheral benzodiazepine receptor during human colorectal carcinogenesis and tumor spread.
Clin. Cancer Res. 2005, 11(5):1751-1756

Grabowski P.*, Sturm I.*, Schelwies K., Maaser K., Buhr H.J., Zeitz M., Dörken B., Daniel P.T, Scherübl H.. Analysis of neuroendocrine differentiation and the p53/BAX pathway in UICC stage III colorectal carcinoma identifies patients with good prognosis.
International Journal of Colorectal Disease 2006, 21: 221-230

(*Dual first-authorship)

2.2 Wachstumshemmende Effekte spezifischer Liganden des peripheren Benzodiazepinrezeptors auf gastrointestinale Tumorzelllinien

Die häufige Überexpression von PBR in kolorektalen Tumoren (siehe 2.1) qualifiziert PBR als mögliches Zielprotein einer tumorspezifischen Therapie. Um zu untersuchen, ob sich dieser Ansatz auf andere gastrointestinale Tumorentitäten übertragen lässt und um die beteiligten Signalwege zu erfassen, wurde die PBR Expression und seine funktionelle Bedeutung in ösophagealen und hepatozellulären Tumorzelllinien untersucht. Der PBR wird – immunhistochemisch nachgewiesen - sowohl in Ösophaguskarzinomen als auch bei Hepatozellulären Karzinomen exprimiert. Im Gegensatz zu Brustkrebs, wo PBR neben seiner mitochondrialen Lokalisation auch nukleär detektiert wurde (Hardwick et al., 1999) ist der PBR in beiden gastrointestinalen Tumorentitäten ausschließlich im Zytoplasma, und hier wahrscheinlich in den Mitochondrien lokalisiert. Immunhistochemisch konnten wir eine Überexpression des PBR in unseren Patientenkollektiven in 30% der Ösophaguskarzinome und 34% der hepatozellulären Karzinomen nachweisen, d.h. 1/3 dieser Patienten könnten demnach möglicherweise auf eine PBR-basierte Tumorthherapie ansprechen. Dem PBR werden antiproliferative und Apoptose-protective Eigenschaften zugeschrieben. So schützte Transfektion und nachfolgende Überexpression von PBR hämatopoetische Zellen gegen durch UV-Licht oder Wasserstoffperoxid induzierte Apoptose (Stoebner et al., 2001). Bei Brustkrebs wurde für die PBR Expression eine positive Korrelation mit der Fähigkeit, Tumore in Nacktmäusen zu erzeugen, gezeigt (Hardwick et al., 2001).

Diese proliferationsfördernde Funktion des PBR kann durch spezifische Liganden aufgehoben und umgekehrt werden. Bei verschiedenen Tumorentitäten wurden bereits antiproliferative Effekte der PBR Liganden beschrieben. Dabei wurden nicht nur Benzodiazepinderivate wie das 4-Chlorodiazepam (Ro5-4864) eingesetzt, sondern auch das zu den Isoquinolincarboxamiden gehörende PK 11195. Wachstumsinhibierende Effekte dieser Liganden wurden bereits bei Brustkrebs (Beinlich et al., 1999; Carmel et al., 1999), beim Melanom (Landau et al., 1998), bei Hodenkrebs (Garnier et al., 1993) und bei Astrozytomzellen (Neary et al., 1995) nachgewiesen. Eine mögliche antiproliferative Wirkung der spezifischen PBR Liganden auf gastrointestinale Tumore wurde bisher noch nicht untersucht. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die PBR Liganden PK 11195, Ro4-4684 sowie das Indolacetamid FGIN-1-27 (Kozikowski et al., 1993), dessen mögliche wachstumsmodulierende Wirkung bisher noch nicht untersucht wurde, das Wachstum von gastrointestinalen Tumoren hemmen (s. Tabelle 1). Antiproliferative Effekte wurden bei

verschiedenen kolorektalen, ösophagealen und hepatozellulären Zelllinien gezeigt. Die antiproliferativen Effekte waren bei allen drei Tumorentitäten sowohl auf eine Induktion von Apoptose als auch auf einen Zellzyklusarrest in der G1/G0 Phase zurückzuführen. Bei hepatozellulären Karzinomzellen wurde zusätzlich ein Arrest in der G2/M-Phase beobachtet. Die Induktion von Apoptose ging meist mit einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und nachfolgender Aktivierung der Caspase-3 einher.

In der medikamentösen Krebstherapie werden häufig Kombinationen verschiedener Chemotherapeutika eingesetzt. Diese greifen meist an unterschiedlichen Stellen der Wachstumsregulation ein, wodurch die Wirksamkeit gesteigert werden kann. Dies wird unter anderem auf mögliche Umgehung von Resistenzmechanismen der einzelnen Komponenten erklärt. Für die spezifischen PBR Liganden wurde bereits eine sensitivierende Wirkung gegenüber verschiedenen antineoplastischen Agenzien gezeigt. So steigern PBR Liganden die antiproliferativen Effekte von Etoposid, Ifosphamid und Doxorubicin in unterschiedlichen Tumorentitäten (Hirsch et al., 1998; Decaudin et al., 2002; Gamboa-Dominguez et al., 2004). Bei Patienten mit hepatozellulärem Karzinom, die nicht mittels Resektion, Transplantation oder perkutaner Ethanolinjektion behandelt werden können, wird häufig Doxorubicin in der Chemoembolisation eingesetzt. Ich habe bei dieser Tumorentität gezeigt, dass die antiproliferative Wirkung von Doxorubicin durch PBR Liganden gesteigert wird. Des Weiteren wurde eine sensitivierende Wirkung von PBR Liganden in Kombination gegenüber den Chemotherapeutika Paclitaxel und Docetaxel sowie mit dem Bcl-Inhibitor HA-14 nachgewiesen.

Interessanterweise konnte ich in diesen Arbeiten zeigen, dass die PBR Liganden FGIN-1-27 und PK 11195 das Wachstum verschiedener kolorektaler, ösophagealer und hepatozellulärer Zelllinien in vergleichbaren Konzentrationen vermindern (Tabelle 1).

	IC ₅₀ (µM)	
	FGIN-1-27	PK 11195
Kolorektale Zelllinien		
HT-29	14 ± 2	58 ± 9
Ösophageale Zelllinien		
Kyse-140	24 ± 5	56 ± 7
OE-33	23 ± 10	70 ± 6
Hepatozelluläre Zelllinien		
HepG2	20 ± 2	55 ± 3
Huh-7	20 ± 3	43 ± 4

Tabelle 1: Wachstumsinhibitorische Effekte der PBR Liganden auf kolorektale, ösophageale und hepatozelluläre Tumorzellen

Die antiproliferativen Effekte der PBR Liganden waren sowohl durch einen Arrest im Zellzyklus als auch durch Induktion von Apoptose gekennzeichnet. Bei allen Tumorentitäten lösten PBR Liganden Apoptose und einen Arrest in der G1/G0 Phase des Zellzyklus aus. Diese Daten lassen darauf schließen, dass in kolorektalen, ösophagealen und Leberkarzinomzellen PBR Liganden ähnliche Signalwege aktivieren.

Diese durch PBR Liganden induzierten transkriptionellen Veränderungen weiterer Signalmoleküle wurden in dieser Arbeit am Beispiel der kolorektalen Karzinomzelllinien HT29 (p53 mutiert) und der Zelllinien HCT116 Wildtyp und HCT116 p21^{-/-} bestimmt und deren funktionelle Beteiligung an der Regulation von Apoptose und Zellzyklusarrest untersucht. In der Arbeitsgruppe wurden ähnliche Experimente auch für die Ösophaguskarzinomzelllinien Kyse 140 und OE33 durchgeführt (Sutter et al., 2003; Sutter et al., 2004b).

Bei der Reaktion der Zelle auf extrazelluläre Stimuli sind häufig Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKinasen) involviert. Derzeit werden fünf verschiedene MAPKinase-Signalwege in Eukaryonten unterschieden (Roux and Blenis, 2004). Während der p38-MAPKinase Signalweg meist bei der Antwort auf Stressoren aktiviert wird und eher antiproliferative Prozesse auslöst, wird der Signalweg der extrazellulär-regulierten Kinase (ERK) 1/2 durch Wachstumsfaktoren und andere Mitogene aktiviert und induziert Zellproliferation. Andere Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass der p38 MAPKinase Signalweg durch die spezifischen PBR Liganden aktiviert wird (Sutter et al., 2003). Die p38MAPKinase Aktivierung erfolgt Caspase-3 abhängig, da durch einen Caspase-

3 Inhibitor die durch PBR Liganden induzierte Phosphorylierung der p38MAPKinase vermindert wird. Die Aktivierung der p38MAPKinase ist mit einer Induktion der Expression der *growth arrest and DNA damage inducible protein* (gadd)45 und gadd153 assoziiert. Versuche mit einem spezifischen p38MAPKinase Inhibitor haben gezeigt, dass die Aktivierung der p38 MAPKinase bei Ösophaguskarzinomzelllinien eine Voraussetzung der PBR Liganden induzierten Apoptose und des Zellzyklusarrests ist (Sutter et al., 2004a). In dieser Arbeit wurde nun die Modulation des ERK1/2 Signalweges durch PBR Liganden untersucht. Hierbei scheint die Wirkungsweise und der Zeitverlauf der ERK1/2 Modulation zelltypabhängig zu sein: Während bei Ösophaguskarzinomzellen ERK1/2 durch PBR Liganden transient aktiviert wird (Sutter et al., 2004b), bewirken PBR Liganden in kolorektalen Karzinomzellen eine Inaktivierung der ERK1/2. Bei beiden Tumorentitäten können jedoch unabhängig von der direkten Wirkung der Liganden auf den ERK1/2 Signalweg die antiproliferativen Effekte der PBR Liganden durch zusätzliche Blockierung des ERK1/2 Signalwegs (mit einem spezifischen MEK Inhibitor: PD98059) verstärkt werden.

Die Regulation des Zellzyklus erfolgt durch Cyclin-abhängige Kinasen (CDK), die zusammen mit Cyclinen die Transkription der für den weiteren Verlauf des Zellzyklus notwendigen Proteine regulieren. Zellzyklusregulierende Proteine gehören zu den am häufigsten veränderten Molekülen bei neoplastischen Erkrankungen. So ist bei ca. der Hälfte aller kolorektalen Karzinome das Tumorsuppressorgen p53 mutiert (Hollstein et al., 1994). Auch Cyclin D1 ist häufig in gastrointestinalen Tumoren verändert, was mit einer schlechteren Prognose der Patienten einhergeht (Arber et al., 1996; Vitale et al., 2006). Für eine erfolgreiche Krebstherapie ist es nötig, diese veränderten Signalwege zu umgehen. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass PBR Liganden unter Umgehung des mutierten P53 den Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1} induzieren und die Expression von Cyclin D1 vermindern.

In dieser Arbeit wurden die Wirkmechanismen und Signaltransduktionswege der synthetischen PBR Liganden untersucht. Mittels cDNA Arrays wurde die differentielle Genexpression nach PBR Liganden-Behandlung detektiert. Eine Modulation der Genexpression wurde durch semi-quantitative RT-PCR oder auf Proteinebene durch Western Blot Analyse gesichert. Für alle untersuchten Moleküle konnten die Genexpressionsanalysen mit einer der anderen Methoden bestätigt werden. Dies zeigt, dass die differentielle Genexpressionsanalyse mittels der cDNA-Array Technologie eine geeignete Methode zur Bestimmung der molekularen Wirkmechanismen und Signalwege darstellt.

Zelluläre Prozesse werden jedoch nicht nur durch Expressionsmodulation reguliert. Häufig erfolgt die Signalweiterleitung durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung oder

Stabilisation und Abbau der Signalmoleküle. Deshalb wurden in dieser Arbeit der Phosphorylierungsstatus und Proteinhöhe bestimmter Signalmoleküle mittels Western Blot Analyse detektiert. Spezifische Inhibitoren und *knock-out* Zelllinien (HCT116 wildtyp und HCT116 p21^{-/-}) wurden eingesetzt, um die funktionelle Relevanz der involvierten Signalmoleküle zu bestimmen.

Die Signalwege, die zur PBR Liganden induzierten Apoptose und Zellzyklusarrest führen, sind in Abbildung 3 dargestellt. Die PBR Liganden-induzierte Apoptose wird durch Mitochondrien vermittelt. Dieses wird durch Bcl-2, Bcl-X_L und Bax reguliert. Dabei sind die genauen Mechanismen Liganden-abhängig. Während die FGIN-1-27-induzierte Apoptose abhängig von einer Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials ist, verändert sich das mitochondriale Membranpotential bei Behandlung mit PK 11195 in kolorektalen Karzinomzellen nicht. Apoptose wird dort vielmehr durch eine Induktion von ROS sowie eine Translokation und Dimerisierung von Bax in der mitochondrialen Membran vermittelt. Nachfolgend werden die Effektor-Caspasen 9 und 3 aktiviert, was direkt oder indirekt über eine Aktivierung der p38MAPKinase und nachfolgender Induktion der gadd153 und 45 zur Apoptose führt. Ähnliche Ergebnisse konnten in unserer Arbeitsgruppe für ösophageale Karzinomzellen gefunden werden (Sutter et al., 2003).

Beim PBR Liganden induzierten Zellzyklusarrest sind drei (interagierende) Signalwege beteiligt. Der erste führt über eine Aktivierung der Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1} zu einer Verminderung von Cyclin D1 und nachfolgendem Arrest. Der zweite Weg beinhaltet die Induktion der gadd153 und 45. Außerdem könnte die Induktion des cdc16 eine Rolle spielen. Cdc16 ist als ein Kernprotein für die maximale Aktivität des *anaphase-promoting complex* (APC) verantwortlich. Dieser Komplex schützt die Zelle vor einem frühzeitigen Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus, indem er Cycline wie das Cyclin B degradiert.

Die *up-stream* Regulatoren dieser Signalwege sind Gegenstand der derzeitigen Forschung.

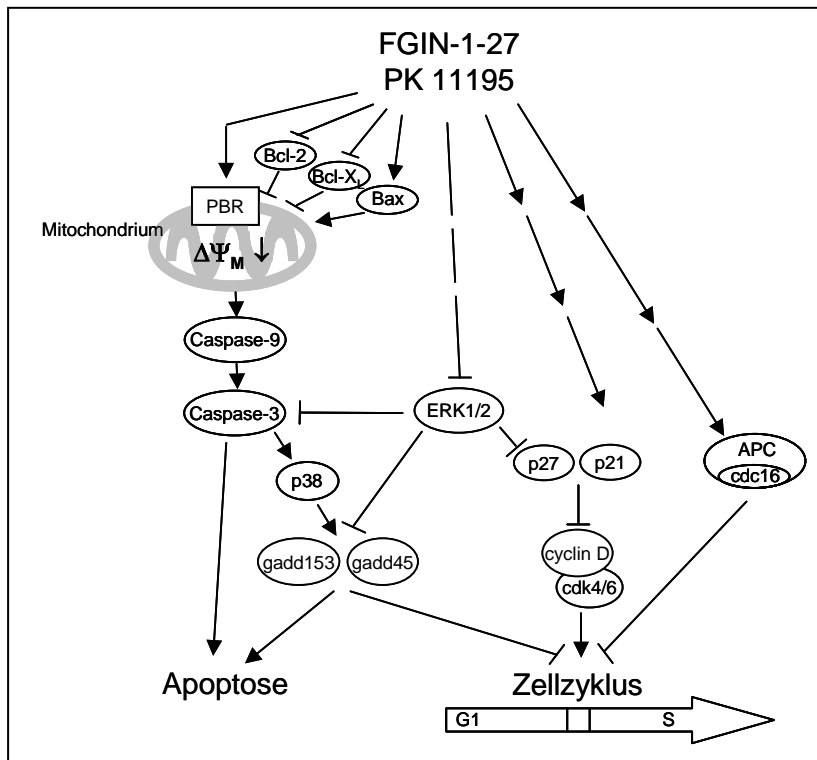


Abbildung 3: Signalwege der PBR Liganden induzierten Apoptose und des Zellzyklusarrests.

→ Aktivierung / Stimulation —| Inaktivierung / Inhibition

Die zellulären Prozesse wie die Abnahme des mitochondriale Apoptose, die Aktivierung der Caspasen 9 und 3, die Induktion der *gadd's* und die Verminderung der Cycline wurden in beiden untersuchten Tumorentitäten (Kolorektum, Ösophagus) beobachtet. Dies lässt auf eine universelle PBR Liganden-induzierte Signaltransduktion schließen. Ausnahme bildete die Modulation von ERK1/2. In kolorektalen Zellen führten PBR Liaganden wie in Abbildung 3 dargestellt zu einer Inaktivierung von ERK1/2, während ERK1/2 in Ösophaguszellen transient aktiviert wurde (Sutter et al., 2004a). Die Gründe hierfür sind noch unklar.

Die PBR Spezifität der exogenen PBR Liganden wurde mittels Strukturanaloga, die keine Affinität zu PBR aufwiesen, gezeigt. Diese Strukturanaloga zeigten keinen Einfluss auf die Regulation von Apoptose oder Zellzyklus. Trotzdem wird die Spezifität der PBR Liganden kontrovers diskutiert, da die Konzentrationen, die zur Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest notwendig sind, im mikromolaren Konzentrationsbereich liegen und somit die nanomolaren Bindungsaffinitäten weit übersteigen. Verschiedene Faktoren wie die Metabolisierung der Liganden, Konkurrenz mit endogenen Liganden oder Absorption der

Liganden durch das Nährmedium könnten für diese Konzentrationsdifferenz verantwortlich sein.

Eigene Referenzen:

Sutter A.P., Maaser K., Höpfner M., Barthel B., **Grabowski P.**, Faiss S., Carayon P., Zeitz M., Scherübl H.

Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human esophageal cancer cells.

Int J. Cancer 2002, 102(4): 318-327

Maaser K., Sutter A.P., Krahn A., Höpfner M., **Grabowski P.**, Scherübl H.

Cell cycle related signaling pathways modulated by peripheral benzodiazepine receptor ligands in colorectal cancer cells

Biochem. Biophys. Res. Comm. 2004, 324: 878-886

Sutter A. P., Maaser K., **Grabowski P.**, Bradacs G., Vormbrock K., Höpfner M., Krahn A., Heine B., Stein H., Somasundaram R., Schuppan D., Zeitz M., Scherübl H.

Peripheral benzodiazepine receptor ligands induce apoptosis and cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cells and enhance chemosensitivity to paclitaxel, docetaxel, doxorubicin and the Bcl-2 inhibitor HA14-1.

J.Hepatol. 2004, 41(5): 799-807

2.3 Expression und prognostische Bedeutung von Survivin bei gastrointestinalen Tumoren

Ein anderes interessantes „Ziel“ für innovative Ansätze in Diagnostik und Therapie gastrointestinaler Tumorerkrankungen ist das anti-apoptotische Protein Survivin. Dieses wurde 1997 von Ambrosini erstbeschrieben und ist seither Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung. Eine Reihe von Arbeiten haben sich mit der Fragestellung der Expression von Survivin bei verschiedenen Tumorentitäten beschäftigt, und welche funktionelle Bedeutung Survivin in diesem Zusammenhang besitzen könnte. Die meisten Arbeiten konnten eine Assoziation von der Expression von Survivin mit einer schlechten Prognose für den Patienten finden (s. Tabelle 2).

Tumorentität	Literatur
Mamma	(Tanaka et al., 2000)
Lunge	(Shinohara et al., 2005)
Kopf-Hals	(Muzio et al., 2005)
Kolorektum	(Kawasaki et al., 1998)
Ösophagus	(Mega et al., 2006b)
Magen	(Miyachi et al., 2003)
Leber	(Fields et al., 2004)
Hirn	(Uematsu et al., 2005)
Blase	(Weikert et al., 2005)

Tabelle 2:

Survivin-Expression korreliert bei verschiedenen Tumorentitäten signifikant mit einer schlechteren Prognose.

Ich habe in meiner Arbeit ein Kollektiv von 84 Ösophaguskarzinompatienten, die zwischen 1982 und 1993 an der Charité-Campus Benjamin Franklin an einem Plattenepithel-karzinom operiert worden sind, retrospektiv untersucht. Wie schon bei den kolorektalen Karzinompatienten besteht der große Vorteil in einem solchen Vorgehen, dass vergleichbare Patientengruppen untersucht werden. Insbesondere wenn man die recht hohe postoperative Morbidität und 30-Tage-Mortalität betrachtet, ist eine „single-center“ Untersuchung mit gleichbleibenden Chirurgen für eine Arbeit über prognostische Marker in diese Tumorentität

von Bedeutung. Wir waren die ersten, die eine Expression des Survivin-Proteins immunhistochemisch bei diesen Tumoren nachweisen konnten (zuvor gab es eine Arbeit auf mRNA-Ebene (Kato et al., 2001)). Ausserdem haben wir als eine der ersten die Bedeutung der Lokalisation von Survivin erkannt und eine prognose-bestimmende Bedeutung der *nukleären* Lokalisation nachgewiesen. In derselben Arbeit haben wir eine deutliche Steigerung der immunhistochemisch detektierbaren Expression von Survivin in den niedriggradigen respektive höhergradigen Dysplasien des Plattenepithels zeigen können, sowie eine Verschiebung der zytoplasmatischen zur nukleären Lokalisation während der malignen Transformation. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Überexpression von Survivin ein frühes Ereignis in der Genese ösophagealer Plattenepithelkarzinome ist ((Martinez et al., 2004; Javle et al., 2004; Lu et al., 2004; Fields et al., 2004). Einige Berichte verbinden mit der nukleären Expression von Survivin allerdings eine gute Prognose (Okada et al., 2001; Kennedy et al., 2003; Tonini et al., 2005) bzw. finden keinen Einfluss auf die Prognose (Sagol et al., 2005). Nakagawa und Kollegen (Nakagawa et al., 2004) zeigten kürzlich, dass nukleäres Survivin hauptsächlich in akuter lymphatischer Leukämie nachweisbar ist, während die zytoplasmatische Form besonders in chronischer lymphatischer Leukämie auftritt. Die cytoplasmatische Expression von Survivin, wie wir sie auch bei den Ösophagus-karzinomen nachweisen konnten, hat weder in unserem Kollektiv, noch bei anderen Autoren eine prognostische Bedeutung (Dabrowski et al., 2004).

Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedliche Lokalisation von Survivin könnte in der Verteilung und Bedeutung der Spleißvarianten liegen. Von Survivin existieren mehrere Spleißvarianten, die in verschiedenen Zellkompartimenten angetroffen werden (Mahotka et al., 1999; Mahotka et al., 2002b). Offensichtlich agieren diese Spleißvarianten als „intrinsische Gegenspieler“, z.B. hat Survivin 2B seine anti-apoptotische Funktion verloren und wirkt wie eine „Bremse“ beim Tumorwachstum. Folgerichtig geht diese Spleißvariante bei Fortschreiten der Tumore verloren (Krieg et al., 2002; Mahotka et al., 2002a). Die Rolle der Spleißvarianten wird derzeit wissenschaftlich untersucht.

Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore zeichnen sich durch ein sehr heterogenes Wachstumsverhalten und eine große biologische Bandbreite bei eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten aus. Wir haben die prognostische Bedeutung von Survivin an einem Kollektiv neuroendokriner Tumore retrospektiv untersucht. Dieses Kollektiv umfasst 89 Patienten mit GEP-NETs, die in unserer bzw. in der Marburger Universitätsklinik (Kooperationspartner Herr Prof. Dr. R. Arnold) und in der Freiburger Universitätsklinik (Kooperationspartner Herr. PD Dr. C. Arnold) zwischen 1981 und 2001 betreut wurden. 29

Patienten hatten lokal begrenzte Tumoren; 50 Patienten litten an einem fortgeschrittenen metastasierten GEP-NET. 10 Patienten hatten ein schlecht differenziertes neuroendokrines Karzinom (WHO Klasse III). Alle Patienten konnten bis zu ihrem Tod bzw. für mindestens fünf Jahre nachverfolgt werden. An diesem Kollektiv konnte ich die prognostische Bedeutung der nukleären Expression von Survivin nachweisen – die cytoplasmatische Lokalisation hatte erneut keine prognostische Bedeutung. Nun wird Survivin eine Rolle bei der Caspase-vermittelten Apoptose zugeschrieben, die Hemmung der Umwandlung von (inaktiven) Pro-Caspasen zu (aktiven) Caspasen 3 und 7 findet aber im Zytoplasma statt. Möglicherweise spielt für die prognostische Rolle von Survivin eher die zweite Funktion, bei der Förderung der Mitose, eine Rolle (siehe auch 1.2.1.2.1). Survivin ist an der Zellzyklusregulation in der G2/M-Phase beteiligt, wobei den CDK2 und CDK1-Kinasen eine zentrale Bedeutung zukommt. Die Inhibition dieser Kinasen hat eine Suppression von Cyclin A,B und Survivin sowie eine Hochregulation von p21 zur Folge (Kim et al., 2005). Die Relation zu p53 als zentralem Regulator von Zellzyklus und Apoptose ist komplexer: In HeLa-Zellen wird Survivin in der frühen S-Phase durch p53 supprimiert und damit Apoptose ausgelöst, während Survivin in der mittleren S-Phase durch p53 hochreguliert wird (Jin et al., 2005). Grundsätzlich ist ein intaktes p53 für die Suppression von Survivin verantwortlich (Mirza et al., 2002).

In meinen Untersuchungen zeigte sich Survivin dem Proliferationsmarker Ki-67 interessanterweise überlegen. Es konnte eine Untergruppe von Patienten mit neuroendokrinen Karzinomen im WHO Klasse II ausgemacht werden, deren Tumore ki67 positiv (> 5% der Zellen), aber Survivin negativ (< 5% der Zellen) sind, und die eine erstaunlich gute Prognose haben. Diesen Befund erklärt man sich so, dass ki67 in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert wird, Survivin aber nur in der G2/M-Phase, und die Färbung mit Survivin in dem Fall nicht Ausdruck eines schnellen Tumorstwachstums ist, sondern möglicherweise eines G2/M-Arrestes. Diese Hypothese wird in Zelllinienmodellen weiter untersucht. Erste Anti-Survivin-Strategien mittels si-RNA *in vitro* (Zaffaroni et al., 2005) und mit einem experimentellen Anti-Survivin-Antikörper *in vivo* (Satoh et al., 2009) scheinen recht erfolgsversprechend zu sein. Da es bisher für die neuroendokrinen Tumore nur wenig wirksame medikamentöse Optionen gibt, wäre dies eine interessante neue therapeutische Option.

Eigene Referenzen:

Grabowski P., Kühnel T., Mühr-Wilkenshoff F., Heine B., Stein H., Höpfner M., Germer C.T., Zeitz M., Scherübl H.

Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. British Journal of Cancer 2003, 88(1): 115-119

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

Nuclear survivin is a powerful novel prognostic marker in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease.

Neuroendocrinology 2005, 81:1-9

2.4 Molekulare Charakteristika neuroendokriner Tumore und Karzinome

Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore (GEP-NETs) repräsentieren sehr heterogene Tumore mit sehr unterschiedlichem biologischen Wachstumsverhalten. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Forschung, da diese sich offensichtlich von den pathogenetischen Mechanismen anderer Tumore unterscheiden.

Viele, bei anderen Tumorarten bekannt veränderte Gene wie z.B. der *k-ras*-Signalweg, der bei über 90% der pankreatischen nicht-endokrinen Karzinome eine Rolle spielt, ist bei GEP-NETs nur von untergeordneter Bedeutung: *k-ras*-Mutationen werden nur sporadisch gefunden (Ebert et al., 1998), auch sogar bei undifferenzierten neuroendokrinen Karzinomen (Dacic et al., 2002), während sie bei den kolorektalen Adenokarzinomen in bis zu 60% nachweisbar sind. Dies gilt auch für andere Onkogene, wie z.B. *c-myc*, *n-myc*, *n-ras*, *fos*, *c-jun*, *src*, *c-erbB2* oder *HER2/NEU*, die im Gegensatz zu ihrer Bedeutung bei der Karzinogenese nicht-neuroendokriner Tumore, für die Molekularpathogenese von GEP-NETs vermutlich von geringerer Bedeutung sind (Übersicht bei Calender (Calender, 2000)). Auch das p53-Gen, das in den meisten menschlichen Tumoren mutiert ist, spielt für die Karzinogenese von GEP-NETs keine Rolle (Lohmann et al., 1993; Vortmeyer et al., 1997). Möglicherweise ist die p53-Mutation ein Ereignis, das nur eine Untergruppe der neuroendokrinen Tumore betrifft: In einer Studie von Leotlela (Leotlela et al., 2003) war bei neuroendokrinen Tumore der Lunge die p53-Mutation und der 5p21-Verlust mit aggressiverem Tumorwachstum und kürzerem Überleben assoziiert; auch Dacic und Kollegen (Dacic et al., 2002) fanden p53-Mutationen in allen untersuchten undifferenzierten neuroendokrinen Karzinomen der Lunge und des Magen-Darm-Trakts. In eigenen Untersuchungen konnten wir eine p53-Mutation aber nur bei einem von neun undifferenzierten neuroendokrinen kolorektalen Karzinomen nachweisen (Grabowski et al., 2008). Grundsätzlich geht man davon aus, dass Tumorwachstum eine Dysbalance aus unkontrollierter Zellproliferation und einem defekten Zelltod-Programm ist (Evan and Vousden, 2001). Die Abgrenzung zwischen schlecht differenzierten, hochmalignen neuroendokrinen Karzinomen (definiert als WHO Klasse III), schlecht differenzierten kolorektalen Adenokarzinomen (ohne neuroendokrine Differenzierung) und „normalen“ kolorektalen Adenokarzinomen, die in 20-40% der Fälle eine neuroendokrine Differenzierung aufweisen können, ist schwierig und bisher die Domäne der immunhistochemischen Pathologie. Etablierte neuroendokrine Marker sind Synaptophysin und Chromogranin. Ich habe in dieser Arbeit an 20 Patienten mit schlecht differenzierten kolorektalen Karzinomen anhand von etablierten (Synaptophysin, Chromogranin) und neuen

neuroendokrinen Markern (Proteine des sogenannten SNARE-Komplexes: Synaptobrevin, Syntaxin und SNAP-25, sowie α/β -SNAP) zeigen können, dass deren Expression im Zuge der malignen Transformation unterschiedlich lange erhalten bleibt: Chromogranin A scheint hierbei der am wenigsten verlässliche Marker zu sein. Allerdings zeigen auch die Proteine der regulierten Sekretion (des SNARE-Komplexes) Veränderungen, z.B. dergestalt, dass sie nicht mehr in der Plasmamembran, sondern auch im Zytoplasma nachweisbar waren wie z.B. SNAP25. Dieser Befund deckt sich mit Ergebnissen anderer Autoren (Schmitt-Graff et al., 1997). Bei dieser kleinen Fallzahl von 20 Patienten sind prognostische Aussagen naturgemäß schwierig. Trotzdem konnte ich zeigen, dass die neun Patienten, deren schlecht differenzierte Karzinome neuroendokrine Charakteristika aufweisen, in einem deutlich fortgeschrittenerem Tumorstadium diagnostiziert wurden und deutlich kürzer gelebt haben. Wie schon zuvor bei den kolorektalen Adenokarzinomen mit neuroendokriner Differenzierung, die eine deutlich schlechtere Prognose aufwiesen als ihre „verwandten“ Adenokarzinome ohne eine solche Differenzierung (Grabowski et al., 2001), gehe ich davon aus, dass hier Proliferationsfaktoren eine Rolle spielen, die von den neuroendokrinen Zellen autokrin oder parakrin sezerniert werden. In einer anderen Arbeit an einer größeren Patientengruppe von 38 neuroendokrinen Tumoren/Karzinomen, 35 schlecht differenzierten kolorektalen neuroendokrinen Karzinomen und 150 sporadischen kolorektalen Karzinomen haben wir ebenfalls zeigen konnten (Arnold et al., 2008), dass diese Tumorentitäten trotz einiger molekularer Ähnlichkeiten wie dem CpG island Methylator Phänotyp (CIMP), der regelhaft bei sporadischen kolorektalen Karzinomen, aber auch bei einer Reihe neuroendokriner Tumore zu finden war, auch deutliche molekulare Unterschiede aufwiesen, wie z.B. die p16-Promoter-Methylierung. Diese ist in dieser wie auch in Vorgängerstudien bei neuroendokrinen Tumoren nachgewiesen worden, allerdings bisher mit widersprüchlichen Ergebnissen: Muscarella und Kollegen (Muscarella et al., 1998) hatte an Gastrinomen und nicht-funktionellen neuroendokrinen Tumoren des Pankreas p16 in 90% der Fälle durch Methylierung oder Deletion inaktiviert gefunden. Allerdings zeigte schon die Folgestudie von Serrano et al (Serrano et al., 2000) eine Hypermethylierung der p16-Promoterregion nur bei 52% der dort untersuchten Gastrinome. Lubomierski und Kollegen (Lubomierski et al., 2001) konnten in ihrer Studie die Inaktivierung und den Verlust der CDKN2A/p16-Expression bestätigen, allerdings nur in kleinen intestinalen neuroendokrinen Tumoren und Pankreastumoren, nicht in Gastrinomen oder Insulinomen. In einer anderen Studie von Moore (Moore et al., 2001) war das p16-Gen überhaupt nur bei einem Tumor (einem Insulinom) mutiert, während alle anderen, hauptsächlich nicht-funktionellen Pankreastumore überhaupt keine genetische

Veränderung aufwies. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, dass die beschriebenen p16-Veränderungen auf funktionelle neuroendokrine Tumore beschränkt sind. Wir konnten die p16 Methylierung sogar mit einer schlechteren Prognose korrelieren. Andere Zykline und Zyklin-abhängigen Kinasen, die verschiedene Phasen des Zellzyklus regulieren, und die Rolle ihrer Inhibitoren, wie zum Beispiel p27 und p21 als Tumorsuppressorgene waren kürzlich auch in GEP-NETs untersucht worden. So beobachteten Canavese und Kollegen (Canavese et al., 2001) eine hohe Expression von p27 und eine niedrige p21-Expression bei gut differenzierten neuroendokrinen Tumoren. p27 ist möglicherweise ein wichtiger Inhibitor der Zellproliferation von GEP-NETs; dementsprechend fand sich bei undifferenzierten neuroendokrinen Karzinomen nur eine sehr niedrige p27-Expression. In meinen eigenen Untersuchungen konnte ich die Ergebnisse von Canavese bestätigen und deutlich erweitern. Wir sehen die gut differenzierten neuroendokrinen Tumore und Karzinome (WHO Klasse I und II) als völlig – auch molekulargenetisch – abzugrenzen von den Karzinomen der WHO Klasse III, wie auch schon Vortmeyer postuliert hatte (Vortmeyer et al., 1997). Bei unserem bereits beschriebenen Patientenkollektiv von 89 GEP-NETs unterschiedlicher Differenzierung konnte der Zellzyklus-Inhibitor p27 bei 26/29 gut differenzierten neuroendokrinen Karzinomen (WHO Klasse I), aber nur bei 30/50 gut differenzierten neuroendokrinen Karzinomen (WHO Klasse II) und bei keinem der zehn schlecht differenzierten neuroendokrinen Karzinome (WHO Klasse III) nachgewiesen werden. Parallel dazu zeigte sich eine Expression von CyclinE als Marker der aktivierten CDK2-Komplexe mit zunehmender schlechter Differenzierung. Bei den Karzinomen der WHO Klasse II konnte eine niedrige p27/hohe CyclinE-Expression sogar die Patienten mit einer deutlich schlechteren Prognose identifizieren. Dies konnten wir in Zellkultur-Experimenten mit p27siRNA an neuroendokrinen Tumorzelllinien nachvollziehen: Die Herunter-Regulation von p27 führte zu einer deutlichen Verschiebung des Anteils der sich in der aktiven Zellphase befindlichen Tumorzellen. Hier könnten sich weitere innovative therapeutische Ansätze ergeben, z.B. durch Gentransfer von p27.

Eigene Referenzen:

Grabowski P., Schönfelder J., Ahnert-Hilger G., Foss H.D., Heine B., Schindler I., Stein, H. Berger G., Zeitz M., Scherübl H..

Expression of neuroendocrine markers: A signature of human undifferentiated carcinoma of the colon and rectum.

Virchows Archives 2002, 441(3): 256-263

Grabowski P., Schrader J., Wagner J., Hörsch D., Arnold R., Arnold C.N., Georgieva I., Stein H., Zeitz M., Daniel P.T., Sturm I..

Loss of nuclear p27 expression and its prognostic role in relation to cyclin E and p53 mutation in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.

Clinical Cancer Research 2008, 14: 7378-7384

Arnold C.N., Nagasaka T., Goel A., Scharf I., **Grabowski P.**, Sosnowski A., Schmitt-Gräf A., Boland C.R., Arnold R., Blum H.E..

Molecular characteristics and predictors of survival in patients with malignant neuroendocrine tumors.

International Journal of Cancer 2008, 123(7):1556-64

3 Zusammenfassung

Patienten mit gastrointestinalen Tumoren haben eine unterschiedlich gute Prognose, die trotz intensiver wissenschaftlicher Bemühungen noch immer am meisten von dem TNM-Stadium bei Diagnosestellung abhängt. Etablierte Prognose-Biomarker, die routinemäßig einsetzbar sind, um eine Aussage über das zu erwartende biologische Verhalten des Tumors zu treffen, gibt es bislang nicht.

3.1 Nachweis prognostisch relevanter, neuer Markerproteine für die Diagnostik gastrointestinaler Tumore

Anhand von einem definierten Patientenkollektiv kolorektaler Karzinome konnte ich zeigen, dass der periphere Benzodiazepinrezeptor (PBR) in 88 % der kolorektalen Karzinome im Stadium UICC III und UICC IV im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert ist und im Stadium UICC III einen negativen prognostischen Faktor darstellt. Neben PBR habe ich an demselben Patientenkollektiv weitere prognostische Faktoren wie die neuroendokrine Differenzierung, eine erhöhte Sialyl-Le^X-Expression, Mutationen im p53-Gen und eine verminderte Bax-Expression identifiziert. Ich konnte nachweisen, dass Patienten mit neuroendokrin differenzierten kolorektalen Karzinomen (ca. 40%) eine signifikant schlechtere Prognose haben als die Patienten mit nicht neuroendokrin differenzierten Adenokarzinomen des Kolon und Rektums. Erstmals konnte ich zeigen, dass ein alterierter p53/Bax-Signaltransduktionsweg mit einem signifikant schlechteren klinischen Verlauf im Stadium UICC III kolorektaler Karzinome korreliert. Im Fall des Sialyl-Le^X, dessen Expression mit Tumorzellextavasation und Metastasierung in Verbindung gebracht wird, habe ich neben den Patienten mit UICC III und IV-Tumoren auch Patienten mit einem früheren Stadium, UICC II, untersucht. Der Prozentsatz von stark exprimierenden Karzinomen stieg mit fortschreitendem Tumorstadium an. Eine starke Sialyl-Le^X-Expression erhöhte das relative Risiko am Tumor zu versterben im Stadium II 31/2 fach. Hier bietet sich ein neuer Ansatz zur Stratifizierung, welche Patienten in diesem frühen Stadium von einer zusätzlichen Therapie profitieren könnten. Neben der Analyse einzelner prognostischer Marker konnte ich in dieser Arbeit aber auch zeigen, dass eine Kombination verschiedener prognostischer Marker, die verschiedene genetische Ereignisse repräsentieren und unabhängig voneinander sind, eine deutlich bessere prognostische Aussagefähigkeit besitzen als nur ein Marker alleine. Hier wurde die sogenannte multifaktorielle Diskriminanzanalyse angewendet. Dadurch ist es möglich,

Subgruppen zu definieren, die, wenn man es weiterdenkt, im Sinne einer besseren Prognose mit der „klassischen Therapie“ übertherapiert sind.

Ein anderes interessantes Ziel für innovative Ansätze in Diagnostik und Therapie gastrointestinaler Tumorerkrankungen ist das anti-apoptotische Protein Survivin. Zu Beginn meiner Arbeiten war bekannt, dass die Survivin-Expression bei verschiedenen Tumorentitäten mit einer schlechteren Prognose korreliert. Ich habe in meiner Arbeit sowohl bei Ösophaguskarzinompatienten als auch bei GEP-NET-Patienten eine Expression des Survivin-Proteins immunhistochemisch nachweisen können und ausserdem als eine der ersten die Bedeutung der Lokalisation von Survivin erkannt und eine prognosebestimmende Bedeutung der *nukleären* Lokalisation nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Lokalisation von Survivin könnte in der Verteilung und Bedeutung der in verschiedenen Zellkompartimenten vorliegenden Spleißvarianten von Survivin liegen (der für die immunhistochemischen Arbeiten verwendete Antikörper detektiert das volle Protein von Survivin und somit auch das N-terminale Ende von Survivin, das in allen Spleißvarianten gleich vorhanden ist). Die unterschiedliche Rolle der Spleißvarianten wird derzeit wissenschaftlich untersucht.

In der Arbeit zu Ösophaguskarzinomen habe ich eine deutliche Steigerung der immunhistochemisch detektierbaren Expression von Survivin in den niedriggradigen respektive höhergradigen Dysplasien des Plattenepithels des Ösophagus zeigen können, sowie eine Verschiebung der zytoplasmatischen zur nukleären Lokalisation während der malignen Transformation. Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Überexpression von Survivin ein frühes Ereignis in der Genese ösophagealer Plattenepithelkarzinome ist.

Interessanterweise zeigte sich in meinen Untersuchungen zu GEP-NETs Survivin dem Proliferationsmarker Ki-67 überlegen. Es konnte eine Untergruppe von Patienten mit neuroendokrinen Karzinomen im WHO Stadium II ausgemacht werden, deren Tumore ki67 positiv (> 5% der Zellen), aber Survivin negativ (< 5% der Zellen) sind, und die eine erstaunlich gute Prognose haben. Während ki67 in allen Phasen des Zellzyklus exprimiert wird, wird Survivin nur in der G2/M-Phase exprimiert, so daß die Färbung mit Survivin in dem Fall nicht Ausdruck eines schnellen Tumorwachstums ist, sondern möglicherweise eines G2/M-Arrestes. Diese Hypothese wird in Zelllinienmodellen weiter untersucht.

Exemplarisch habe ich mir an einem der gefundenen Marker-Proteine die Karzinogenese genauer angeschaut. Hier lässt die häufige Überexpression des PBR in kolorektalen Karzinomen auf eine funktionelle Bedeutung des PBR in der Tumorentwicklung schließen.

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass PBR schon in frühen Adenomen (kleine Adenome mit geringgradigen Dysplasien) mit vergleichbarer Häufigkeit wie in Karzinomen hochreguliert ist. Ebenso häufig weisen Metastasen kolorektaler Karzinome eine PBR Überexpression auf. Das Ausmaß der Überexpression war in den Metastasen im Vergleich zu den Karzinomen sogar noch erhöht. Die frühe und bis zur Metastasierung anhaltende Hochregulation des PBR lässt auf eine wichtige Rolle des PBR in der kolorektalen Karzinogenese und Metastasierung schließen.

3.2 Modulation der neu definierten Prognosemarker exemplarisch am PBR *in vitro* und Messung der spezifischen Effekte auf Zelllinien

Die häufige Überexpression und prognostische Bedeutung des PBR könnte die Grundlage für neue PBR-basierte diagnostische und therapeutische Ansätze bilden. Um zu untersuchen, ob sich dieser Ansatz auf andere gastrointestinale Tumorentitäten übertragen lässt und um die beteiligten Signalwege zu erfassen, wurde die PBR Expression und seine funktionelle Bedeutung auch in ösophagealen und hepatozellulären Tumorzelllinien untersucht. Immunhistochemisch konnten wir eine Überexpression des PBR in unseren Patientenkollektiven in 30% der Ösophaguskarzinome und 34% der hepatozellulären Karzinomen nachweisen, d.h. 1/3 dieser Patienten könnten demnach möglicherweise auf eine PBR-basierte Tumorthherapie ansprechen.

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass die spezifischen exogenen PBR Liganden FGIN-1-27, PK 11195 und Ro5-4684 sowohl bei kolorektalen als auch bei ösophagealen und hepatozellulären Zelllinien wachstumshemmende Wirkung zeigen. Darüber hinaus steigerten sie beim hepatozellulären Karzinom die antiproliferativen Effekte etablierter und experimenteller antineoplastischer Substanzen wie Paclitaxel, Docetaxel, Doxorubicin und des Bcl-2 Inhibitors HA14-1. Die Wirksamkeit der PBR Liganden lag bei allen untersuchten Tumorentitäten (Kolorektum, Ösophagus, Leber) im ähnlichen Konzentrationsbereich. Ihre antiproliferativen Effekte beruhen sowohl auf einer Induktion von Apoptose als auch auf einer Arretierung des Zellzyklus. Dies lässt auf gemeinsame Signalwege schließen.

Der PBR ist in der Mitochondrienmembran mit der *permeability transition pore* assoziiert, die essentiell für die mitochondrienvermittelte Apoptose ist. Ich habe gezeigt, daß die durch PBR Liganden ausgelöste Apoptose mitochondrienabhängig ist. PBR Ligand FGIN-1-27 induziert einen Abfall des mitochondrialen Membranpotentials, nachfolgende Caspase-3 Aktivierung und DNA Fragmentation. Die PK 11195-induzierte

mitochondriale Apoptose wird durch die Translokation und Dimerisation von Bax sowie durch eine Induktion der reaktiven Sauerstoffspezies vermittelt. Die Expression der Bcl-2 Proteine Bcl-2 und Bcl-X_L, die die mitochondriale Apoptose regulieren, wird durch PBR Liganden moduliert.

Am PBR Liganden-induzierten Zellzyklusarrest sind drei (interagierende) Signalwege beteiligt. PBR Liganden induzieren die Expression bzw. Stabilität der Zellzyklusinhibitoren p21^{Cip1} und p27^{Kip1}. Diese vermindern die Cyclin D1 Expression, welche den Übergang der G1 Phase zur S-Phase des Zellzyklus steuert. Als Folge der Cyclin D1 Hemmung tritt ein Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus auf. Versuche mit einer p21^{Cip1}-defizienten Zelllinie zeigten, dass der durch p21^{Cip1} vermittelte Signalweg beim PBR Liganden-induzierten Zellzyklusarrest essentiell ist. Außerdem deaktivieren PBR Liganden transient die MAPKinase ERK1/2. ERK1/2 kann dann einerseits nicht mehr den Abbau von p27^{Kip1} vermitteln, andererseits steigt die Expression der *growth arrest and DNA-damage-inducible genes* (gadd) 45 und 153. Gadd45 und 153 sind dafür bekannt, dass sie sowohl Apoptose induzieren als auch einen Arrest des Zellzyklus auslösen. Des Weiteren induzieren PBR Liganden die Expression des cdc16, das das Kernprotein des *anaphase-promoting complex* ist. Dieser Proteinkomplex schützt Zellen u.a. vor einem vorzeitigen Eintritt in die S-Phase, z.B. bei DNA-Schäden.

3. 3. Charakterisierung der gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumore

Viele, bei anderen Tumorarten bekannt veränderte Gene wie z.B. der *k-ras*-Signalweg, der bei über 90% der pankreatischen nicht-endokrinen Karzinome eine Rolle spielt, ist bei GEP-NETs nur von untergeordneter Bedeutung. Dies gilt auch für andere bekannte Onkogene, wie z.B. *myc*, *ras*, *fos*, *jun*, *src* oder *HER2/NEU*. Die Abgrenzung zwischen schlecht differenzierten, hochmalignen neuroendokrinen Karzinomen (definiert als WHO Klasse III), schlecht differenzierten kolorektalen Adenokarzinomen (ohne neuroendokrine Differenzierung) und „normalen“ kolorektalen Adenokarzinomen, die in 20-40% der Fälle eine neuroendokrine Differenzierung aufweisen können, ist schwierig und bisher die Domäne der immunhistochemischen Pathologie. Etablierte neuroendokrine Marker sind Synaptophysin und Chromogranin. Ich habe in dieser Arbeit an 20 Patienten mit schlecht differenzierten kolorektalen Karzinomen anhand von etablierten (Synaptophysin, Chromogranin) und neuen neuroendokrinen Markern (Proteine des sogenannten SNARE-Komplexes) zeigen können, dass deren Expression im Zuge der malignen Transformation unterschiedlich lange erhalten bleibt: Chromogranin A scheint hierbei der am wenigsten

verlässliche Marker zu sein. Allerdings zeigen auch die Proteine der regulierten Sekretion (des SNARE-Komplexes) Veränderungen, z.B., dass sie nicht mehr in der Plasmamembran, sondern auch im Zytoplasma nachweisbar waren wie z.B. SNAP25. Bei dieser kleinen Fallzahl von 20 Patienten sind prognostische Aussagen naturgemäß schwierig. Trotzdem konnte ich zeigen, dass die neun Patienten, deren schlecht differenzierte Karzinome neuroendokrine Charakteristika aufweisen, in einem deutlich fortgeschrittenem Tumorstadium diagnostiziert wurden und deutlich kürzer gelebt haben. Wie schon zuvor bei den kolorektalen Adenokarzinomen mit neuroendokriner Differenzierung, die eine deutlich schlechtere Prognose aufwiesen als ihre „verwandten“ Adenokarzinome ohne eine solche Differenzierung, gehe ich davon aus, dass hier Proliferationsfaktoren eine Rolle spielen, die von den neuroendokrinen Zellen autokrin oder parakrin sezerniert werden. In einer anderen Arbeit an einer größeren Patientengruppe von 38 neuroendokrinen Tumoren/Karzinomen, 35 schlecht differenzierten kolorektalen neuroendokrinen Karzinomen und 150 sporadischen kolorektalen Karzinomen haben wir ebenfalls zeigen können, dass diese Tumorentitäten trotz einiger molekularer Ähnlichkeiten auch deutliche molekulare Unterschiede aufwiesen, wie z.B. die p16 Promoter-Methylierung. In meiner Arbeit habe ich auch andere Zykline und Zyklin-abhängigen Kinasen, und die Rolle ihrer Inhibitoren, wie zum Beispiel p27 und p21 untersucht. Wir sehen die gut differenzierten neuroendokrinen Tumore und Karzinome (WHO Klasse I und II) als völlig – auch molekulargenetisch – abzugrenzen von den Karzinomen der WHO Klasse III. P27 im Verbund mit CyclinE als Marker der aktivierten CDK2-Komplexe kann bei den Karzinomen der WHO Klasse II Patienten mit einer deutlich schlechteren Prognose identifizieren. Dies konnten wir in Zellkultur-Experimenten mit p27siRNA an neuroendokrinen Tumorzelllinien nachvollziehen. Hier könnten sich weitere innovative therapeutische Ansätze ergeben, z.B. durch Gentransfer von p27.

3.4 Neue Wege für eine patienten-individualisierte Therapie

Der Wunsch eines jeden Onkologen ist es, dem Patienten schon bei Diagnosestellung sagen zu können, wie sich der Tumor biologisch verhalten wird, und welche therapeutischen Möglichkeiten es – für genau diesen Tumor und genau diesen Patienten – geben wird. In der Entwicklung prädiktiver Marker hat es in den letzten Jahren bewundernswerte Fortschritte gegeben, die einer patienten-individualisierten Therapie schon recht nahe kommen, z.B. der Einsatz von Transtuzumab beim Her-2/Neu-positiven Mammakarzinom oder die Testung auf kras-Mutationen beim kolorektalen Karzinom vor

dem Einsatz von EGFR-antagonisierenden Substanzen. Dennoch ist vieles noch unverstanden, z.B. die fehlende Korrelation von VEGF/VEGF-Rezeptor Überexpression bei gastrointestinalen Tumoren und dem hiervon (scheinbar) unabhängigen Ansprechen auf VEGF/R-Inhibitoren wie Bevacizumab oder Sunitinib. In der Wunschliste ganz oben stünde sicher auch eine Therapie, die genau an die Zielstrukturen angreift, die vorher mittels spezieller Bildgebung (wie z.B. im PET) darstellbar waren. Hier sind die gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumore Vorreiter, wo genau eine solche (Peptid-Rezeptor-Radioliganden-) Therapie bei Somatostatin-Rezeptor positiven Tumoren anwendbar ist. Aber auch bei anderen Tumorentitäten scheint sich das PET als Prädiktor für das Ansprechen insbesondere der „neuen“ molekular ausgerichteten Therapien zu etablieren (Stroobants et al, 2003, Lordick et al, 2008). Prognose-vorhersagende Marker, die routinemäßig einzusetzen sind, gibt es dagegen bislang nicht.

Ich habe in meinen Arbeiten nach neuen Zielstrukturen sowohl für die Diagnostik als auch für die Therapie (idealerweise als ein System, wie oben beschrieben) gastrointestinaler Tumore gesucht. Vielversprechend erscheinen mir die PBR-Liganden, die an den bei GI-Tumoren nachweislich überexprimierten PBR angreifen und in anderen Tumorentitäten schon zur Visualisierung und präklinisch therapeutisch genutzt werden. Im Fall von p53, p16 oder p27 werden gentherapeutische Ansätze verwendet, allerdings noch auf Zellkulturebene, ebenso im Fall des Sialyl-Le^X-Gens. Der Survivin-Inhibitor YM155 wird bereits in klinischen Studien eingesetzt (Giaccone et al, 2009). Hier könnte sich ein neuer Ansatz für Diagnostik und Therapie von Ösophaguskarzinomen und GEP-NETs ergeben. Aus pathologischer Sicht werden neue Marker, die an Paraffinmaterialien anwendbar sind, schneller Eingang in die flächendeckende Diagnostik finden als ein Marker, der Frischgewebe erfordert. Immerhin ist es inzwischen möglich, an routinemäßig verarbeiteten Proben quantitative RNA-Expression zu messen.

Denkt man diese Strategie zu Ende, müsste man nach der Entwicklung von Früherkennungs/Prognose- und prädiktiven Biomarkern in gleicherweise eine Strategie entwickeln für die Früherkennung eines Rezidivs sowie eine rezidiv-adaptierte Prognose und Therapie. Dies sollte langfristig dazu beitragen, dass Patienten mit Tumoren des Gastrointestinaltraktes zukünftig eine deutlich bessere Prognose aufweisen, weil man dann, anstatt dem Tumorleiden in einem meist empirischen Patientenmanagement hinterher zu laufen, eine vorausschauende, Tumor- und Patienten-individualisierte Medizin betreiben kann. Dies kann einen höheren Kosten-Nutzen-Effekt aufweisen, da Therapien wirksam eingesetzt werden und somit Kosten im Gesundheitssystem gespart werden können.

4 Literaturverzeichnis

Abou-Alfa,G.K., Schwartz,L., Ricci,S., Amadori,D., Santoro,A., Figer,A., De Greve,J., Douillard,J.Y., Lathia,C., Schwartz,B., Taylor,I., Moscovici,M., and Saltz,L.B. (2006). Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 24, 4293-4300.

Altieri,D.C. (2003). Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 22, 8581-8589.

Ambrosini,G., Adida,C., and Altieri,D.C. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat. Med.* 3, 917-921.

Andre,T., Boni,C., Mounedji-Boudiaf,L., Navarro,M., Tabernero,J., Hickish,T., Topham,C., Zaninelli,M., Clingan,P., Bridgewater,J., Tabah-Fisch,I., and de Gramont,A. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 2343-2351.

Anholt,R.R., Pedersen,P.L., De Souza,E.B., and Snyder,S.H. (1986). The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* 261, 576-583.

Arber,N., Hibshoosh,H., Moss,S.F., Sutter,T., Zhang,Y., Begg,M., Wang,S., Weinstein,I.B., and Holt,P.R. (1996). Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology.* 110, 669-674.

Arnold,C.N., Nagasaka,T., Goel,A., Scharf,I., Grabowski,P., Sosnowski,A., Schmitt-Gräff,A., Boland,C.R., Arnold,R., and Blum,H.E. (2008). Molecular characteristics and predictors of survival in patients with malignant neuroendocrine tumors. *Int. J. Cancer.* 123, 1556-1564.

Asanuma,K., Moriai,R., Yajima,T., Yagihashi,A., Yamada,M., Kobayashi,D., and Watanabe,N. (2000). Survivin as a radioresistance factor in pancreatic cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* 91, 1204-1209.

Badran,A., Yoshida,A., Ishikawa,K., Goi,T., Yamaguchi,A., Ueda,T., and Inuzuka,M. (2004). Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 902-907.

Banati,R.B., Newcombe,J., Gunn,R.N., Cagnin,A., Turkheimer,F., Heppner,F., Price,G., Wegner,F., Giovannoni,G., Miller,D.H., Perkin,G.D., Smith,T., Hewson,A.K., Bydder,G., Kreutzberg,G.W., Jones,T., Cuzner,M.L., and Myers,R. (2000). The peripheral benzodiazepine binding site in the brain in multiple sclerosis: quantitative in vivo imaging of microglia as a measure of disease activity. *Brain.* 123, 2321-2337.

Bareiss,D., Stabenow,R., Muller,R., Eisinger,B., Stegmaier,C., Däubler,P., Zeitz,M., and Scherübl,H. (2002). Current epidemiology of carcinoma of the esophagus and cardia in Germany. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 127, 1367-1374.

Beinlich,A., Strohmeier,R., Kaufmann,M., and Kuhl,H. (1999). Specific binding of benzodiazepines to human breast cancer cell lines. *Life Sci.* 65, 2099-2108.

- Belyanskaya,L.L., Hopkins-Donaldson,S., Kurtz,S., Simoes-Wust,A.P., Yousefi,S., Simon,H.U., Stahel,R., and Zangemeister-Wittke,U. (2005). Cisplatin activates Akt in small cell lung cancer cells and attenuates apoptosis by survivin upregulation. *Int. J. Cancer* 117(5):755-63.
- Beurdeley-Thomas,A., Miccoli,L., Oudard,S., Dutrillaux,B., and Poupon,M.F. (2000). The peripheral benzodiazepine receptors: a review. *J. Neurooncol.* 46, 45-56.
- Blot,W.J. and McLaughlin,J.K. (1999). The changing epidemiology of esophageal cancer. *Semin. Oncol.* 26, 2-8.
- Bokemeyer,C., Bondarenko,I., Makhson,A., Hartmann,J.T., Aparicio,J., de Braud,F., Donea,S., Ludwig,H., Schuch,G., Stroh,C., Loos,A.H., Zube,A., and Koralewski,P. (2009). Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 663-671.
- Bollschweiler,E. and Holscher,A.H. (2001). Carcinoma of the esophagus--actual epidemiology in Germany. *Onkologie.* 24, 180-184.
- Bosman,F.T. (1997). Neuroendocrine cells in non-endocrine tumors: what does it mean? *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* 81:62-72.
- Bossy-Wetzell,E., Newmeyer,D.D., and Green,D.R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* 17, 37-49.
- Braestrup,C. and Squires,R.F. (1977). Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 3805-3809.
- Braun,M.S., Richman,S.D., Quirke,P., Daly,C., Adlard,J.W., Elliott,F., Barrett,J.H., Selby,P., Meade,A.M., Stephens,R.J., Parmar,M.K., and Seymour,M.T. (2008). Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer: results from the UK MRC FOCUS trial. *J. Clin. Oncol.* 26, 2690-2698.
- Brenner,B., Tang,L.H., Klimstra,D.S., and Kelsen,D.P. (2004). Small-cell carcinomas of the gastrointestinal tract: a review. *J. Clin. Oncol.* 22, 2730-2739.
- Brown,L.M., Hoover,R., Silverman,D., Baris,D., Hayes,R., Swanson,G.M., Schoenberg,J., Greenberg,R., Liff,J., Schwartz,A., Dosemeci,M., Pottern,L., and Fraumeni,J.F., Jr. (2001). Excess incidence of squamous cell esophageal cancer among US Black men: role of social class and other risk factors. *Am. J. Epidemiol.* 153, 114-122.
- Caldas,H., Honsey,L.E., and Altura,R.A. (2005). Survivin 2alpha: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Mol. Cancer* 4, 11.
- Calender,A. (2000). Molecular genetics of neuroendocrine tumors. *Digestion* 62 Suppl 1: 3-18.
- Canat,X., Guillaumont,A., Bouaboula,M., Poinot-Chazel,C., Derocq,J.M., Carayon,P., LeFur,G., and Casellas,P. (1993). Peripheral benzodiazepine receptor modulation with phagocyte differentiation. *Biochem. Pharmacol.* 46, 551-554.

- Canavese,G., Azzoni,C., Pizzi,S., Corleto,V.D., Pasquali,C., Davoli,C., Crafa,P., Delle,F.G., and Bordi,C. (2001). p27: a potential main inhibitor of cell proliferation in digestive endocrine tumors but not a marker of benign behavior. *Hum. Pathol.* *32*, 1094-1101.
- Carmel,I., Fares,F.A., Leschiner,S., Scherübl,H., Weisinger,G., and Gavish,M. (1999). Peripheral-type benzodiazepine receptors in the regulation of proliferation of MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Biochem. Pharmacol.* *58*, 273-278.
- Carvalho,A., Carmena,M., Sambade,C., Earnshaw,W.C., and Wheatley,S.P. (2003). Survivin is required for stable checkpoint activation in taxol-treated HeLa cells. *J. Cell Sci.* *116*, 2987-2998.
- Chen,K.T. (1989). Composite adenoma-small-cell undifferentiated carcinoma of the colon. *Am. J. Surg. Pathol.* *13*, 429-430.
- Cornu,P., Benavides,J., Scatton,B., Hauw,J.J., and Philippon,J. (1992). Increase in omega 3 (peripheral-type benzodiazepine) binding site densities in different types of human brain tumours. A quantitative autoradiography study. *Acta Neurochir. (Wien.)* *119*, 146-152.
- Costantini,P., Jacotot,E., Decaudin,D., and Kroemer,G. (2000). Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* *92*, 1042-1053.
- Culty,M., Li,H., Boujrad,N., Amri,H., Vidic,B., Bernassau,J.M., Reversat,J.L., and Papadopoulos,V. (1999). In vitro studies on the role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in steroidogenesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *69*, 123-130.
- Cunningham,D., Allum,W.H., Stenning,S.P., Thompson,J.N., van de Velde,C.J., Nicolson,M., Scarffe,J.H., Lofts,F.J., Falk,S.J., Iveson,T.J., Smith,D.B., Langley,R.E., Verma,M., Weeden,S., Chua,Y.J., and MAGIC,T.P. (2006). Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N. Engl. J. Med.* *355*, 11-20.
- Dabrowski,A., Filip,A., Zgodzinski,W., Dabrowska,M., Polanska,D., Wojcik,M., Zinkiewicz,K., and Wallner,G. (2004). Assessment of prognostic significance of cytoplasmic survivin expression in advanced oesophageal cancer. *Folia Histochem. Cytobiol.* *42*, 169-172.
- Dacic,S., Finkelstein,S.D., Baksh,F.K., Swalsky,P.A., Barnes,L.E., and Yousem,S.A. (2002). Small-cell neuroendocrine carcinoma displays unique profiles of tumor-suppressor gene loss in relationship to the primary site of formation. *Hum. Pathol.* *33*, 927-932.
- Daniel,P.T. (2000). Dissecting the pathways to death. *Leukemia* *14*, 2035-2044.
- Daniel,P.T. (2003). Zellzyklus und Apoptose. In: Ganten D und Ruckpaul K (Hrsg.), *Molekularmedizinische Grundlagen von hämatologischen Neoplasien*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Decaudin,D., Castedo,M., Nemat,F., Beurdeley-Thomas,A., De Pinieux,G., Caron,A., Pouillart,P., Wijdenes,J., Rouillard,D., Kroemer,G., and Poupon,M.F. (2002). Peripheral benzodiazepine receptor ligands reverse apoptosis resistance of cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* *62*, 1388-1393.

- Di Fiore,F., Lecleire,S., Rigal,O., Galais,M.P., Ben Soussan,E., David,I., Paillot,B., Jacob,J.H., and Michel,P. (2006). Predictive factors of survival in patients treated with definitive chemoradiotherapy for squamous cell esophageal carcinoma. *World J. Gastroenterol.* *12*, 4185-4190.
- Dollé,F., Luus,C., Reynolds,A. and Kassiou,M. (2009). Radiolabelled molecules for imaging the translocator protein (18Da) using positron emission tomography. *Curr Med Chem.* *16*, 2899-923.
- Ebert,M.P., Hoffmann,J., Schneider-Stock,R., Kasper,H.U., Schulz,H.U., Lippert,H., Roessner,A., and Malfertheiner,P. (1998). Analysis of K-ras gene mutations in rare pancreatic and ampullary tumours. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* *10*, 1025-1029.
- Eriksson,B., Annibale,B., Bajetta,E., Mitry,E., Pavel,M., Platania,M., Salazar,R., and Plockinger,U. (2009). ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: chemotherapy in patients with neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology.* *90*, 214-219.
- Evan,G.I. and Vousden,K.H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* *411*, 342-348.
- Faiss,S., Pape,U.F., Böhmig,M., Dorffel,Y., Mansmann,U., Golder,W., Riecken,E.O., and Wiedenmann,B. (2003). Prospective, randomized, multicenter trial on the antiproliferative effect of lanreotide, interferon alfa, and their combination for therapy of metastatic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors--the International Lanreotide and Interferon Alfa Study Group. *J. Clin. Oncol.* *21*, 2689-2696.
- Fennell,D.A., Corbo,M., Pallaska,A., and Cotter,F.E. (2001). Bcl-2 resistant mitochondrial toxicity mediated by the isoquinoline carboxamide PK11195 involves de novo generation of reactive oxygen species. *Br. J. Cancer.* *84*, 1397-1404.
- Fenoglio-Preiser,C.M. (2001). Gastrointestinal neuroendocrine/neuroectodermal tumors. *Am. J. Clin. Pathol.* *115 Suppl: S79-93*.
- Fields,A.C., Cotsonis,G., Sexton,D., Santoianni,R., and Cohen,C. (2004). Survivin expression in hepatocellular carcinoma: correlation with proliferation, prognostic parameters, and outcome. *Mod. Pathol.* *17*, 1378-1385.
- Fischer,R., Schmitt,M., Bode,J.G., and Haussinger,D. (2001). Expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor and apoptosis induction in hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* *120*, 1212-1226.
- Foster,B.A., Coffey,H.A., Morin,M.J., and Rastinejad,F. (1999). Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science.* *286*, 2507-2510.
- Foxall,C., Watson,S.R., Dowbenko,D., Fennie,C., Lasky,L.A., Kiso,M., Hasegawa,A., Asa,D., and Brandley,B.K. (1992). The three members of the selectin receptor family recognize a common carbohydrate epitope, the sialyl Lewis(x) oligosaccharide. *J. Cell Biol.* *117*, 895-902.
- Galiegue,S., Casellas,P., Kramar,A., Tinel,N., and Simony-Lafontaine,J. (2004). Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in breast cancer and its relationship with survival. *Clin. Cancer Res.* *10*, 2058-2064.

Gamboa-Dominguez,A., Dominguez-Fonseca,C., Quintanilla-Martinez,L., Reyes-Gutierrez,E., Green,D., Angeles-Angeles,A., Busch,R., Hermannstadter,C., Nahrig,J., Becker,K.F., Becker,I., Hofler,H., Fend,F., and Lubner,B. (2004). Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in gastric adenocarcinoma from Mexican patients: a multivariate analysis using a standardized immunohistochemical detection system. *Mod. Pathol.* 17 , 579-587.

Garnier,M., Boujrad,N., Oke,B.O., Brown,A.S., Riond,J., Ferrara,P., Shoyab,M., Suarez-Quian,C.A., and Papadopoulos,V. (1993). Diazepam binding inhibitor is a paracrine/autocrine regulator of Leydig cell proliferation and steroidogenesis: action via peripheral-type benzodiazepine receptor and independent mechanisms. *Endocrinology.* 132, 444-458.

Gavish,M., Bachman,I., Shoukrun,R., Katz,Y., Veenman,L., Weisinger,G., and Weizman,A. (1999). Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol. Rev.* 51, 629-650.

Gavish,M., Katz,Y., Bar-Ami,S., and Weizman,R. (1992). Biochemical, physiological, and pathological aspects of the peripheral benzodiazepine receptor. *J. Neurochem.* 58, 1589-1601.

Giaccone G., Zatloukal P., Roubec J., Floor K., Musil J., Kuta M., van Klaveren R.J., Chaudhary S., Gunther A and Shamsili S. (2009). Multicenter phase II trial of YM155, a small-molecule suppressor of survivin, in patients with advanced, refractory, non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 27, 4481-4486.

Gianani,R., Jarboe,E., Orlicky,D., Frost,M., Bobak,J., Lehner,R., and Shroyer,K.R. (2001). Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum. Pathol.* 32, 119-125.

Gillett,C.E. and Barnes,D.M. (1998). Demystified ... cell cycle. *Mol. Pathol.* 51, 310-316.

Glen,H. and Cassidy,J. (2008). Redefining adjuvant chemotherapy in patients with stage III colon cancer: X-ACT trial. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 8, 547-551.

Grabowski,P., Schindler,I., Anagnostopoulos,I., Foss,H.D., Riecken,E.O., Mansmann,U., Stein,H., Berger,G., Buhr,H.J., and Scherübl,H. (2001). Neuroendocrine differentiation is a relevant prognostic factor in stage III-IV colorectal cancer. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 405-411.

Grabowski,P., Schrader,J., Wagner,J., Hörsch,D., Arnold,R., Arnold,C.N., Georgieva,I., Stein,H., Zeitz,M., Daniel,P.T., and Sturm,I. (2008). Loss of nuclear p27 expression and its prognostic role in relation to cyclin E and p53 mutation in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Clin. Cancer Res.* 14, 7378-7384.

Grossman,D., Kim,P.J., Schechner,J.S., and Altieri,D.C. (2001). Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 635-640.

Güner,D., Sturm,I., Hemmati,P., Hermann,S., Hauptmann,S., Wurm,R., Budach,V., Dörken,B., Lorenz,M., and Daniel,P.T. (2003). Multigene analysis of Rb pathway and apoptosis control in esophageal squamous cell carcinoma identifies patients with good prognosis. *Int. J. Cancer* 103, 445-454.

- Guo,P., Ma,J., Li,S., Guo,Z., Adams,A.L., and Gallo,J.M. (2001). Targeted delivery of a peripheral benzodiazepine receptor ligand-gemcitabine conjugate to brain tumors in a xenograft model. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *48*, 169-176.
- Han,Z., Slack,R.S., Li,W., and Papadopoulos,V. (2003). Expression of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in human tumors: relationship to breast, colorectal, and prostate tumor progression. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* *23*, 225-238.
- Hanski,C. and Itzkowitz,S.H. (2000). Translating the knowledge of molecular alterations that occur during colon carcinogenesis into clinically relevant solutions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *910*, 1-9.
- Hanski,C., Sheehan,J., Kiehntopf,M., Stolze,B., Stein,H., and Riecken,E.O. (1991). Increased number of accessible sugar epitopes defined with monoclonal antibody AM-3 on colonic mucins is associated with malignant transformation of colonic mucosa. *Cancer Res.* *51*, 5342-5347.
- Hardwick,M., Fertikh,D., Culty,M., Li,H., Vidic,B., and Papadopoulos,V. (1999). Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. *Cancer Res.* *59*, 831-842.
- Hardwick,M., Rone,J., Han,Z., Haddad,B., and Papadopoulos,V. (2001). Peripheral-type benzodiazepine receptor levels correlate with the ability of human breast cancer MDA-MB-231 cell line to grow in SCID mice. *Int. J. Cancer.* *94*, 322-327.
- Harris,S.L. and Levine,A.J. (2005). The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene.* *24*, 2899-2908.
- Hattori,M., Sakamoto,H., Satoh,K., and Yamamoto,T. (2001). DNA demethylase is expressed in ovarian cancers and the expression correlates with demethylation of CpG sites in the promoter region of c-erbB-2 and survivin genes. *Cancer Lett.* *169*, 155-164.
- Helpap,B. and Kollermann,J. (2001). Immunohistochemical analysis of the proliferative activity of neuroendocrine tumors from various organs. Are there indications for a neuroendocrine tumor-carcinoma sequence? *Virchows Arch.* *438*, 86-91.
- Helpap,B., Kollermann,J., and Oehler,U. (1999). Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinomas: histogenesis, biology, clinical relevance, and future therapeutical perspectives. *Urol. Int.* *62*, 133-138.
- Hemmati,P.G., Gillissen,B., Von Haefen,C., Wendt,J., Starck,L., Guner,D., Dorken,B., and Daniel,P.T. (2002). Adenovirus-mediated overexpression of p14(ARF) induces p53 and Bax-independent apoptosis. *Oncogene.* *21*, 3149-3161.
- Hiraiwa,N., Dohi,T., Kawakami-Kimura,N., Yumen,M., Ohmori,K., Maeda,M., and Kannagi,R. (1996). Suppression of sialyl Lewis X expression and E-selectin-mediated cell adhesion in cultured human lymphoid cells by transfection of antisense cDNA of an alpha1-->3 fucosyltransferase (Fuc-T VII). *J. Biol. Chem.* *271*, 31556-31561.
- Hirsch,T., Decaudin,D., Susin,S.A., Marchetti,P., Larochette,N., Resche-Rigon,M., and Kroemer,G. (1998). PK11195, a ligand of the mitochondrial benzodiazepine receptor,

facilitates the induction of apoptosis and reverses Bcl-2-mediated cytoprotection. *Exp. Cell Res.* *241*, 426-434.

Hoeijmakers, J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* *411*, 366-374.

Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., Soussi, T., Fuchs, R., Sorlie, T., Hovig, E., Smith-Sorensen, B., Montesano, R., and Harris, C.C. (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.* *22*, 3551-3555.

Holscher, A.H., Bollschweiler, E., Bumm, R., Bartels, H., Hofler, H., and Siewert, J.R. (1995). Prognostic factors of resected adenocarcinoma of the esophagus. *Surgery.* *118*, 845-855.

Hosono, J., Narita, T., Kimura, N., Sato, M., Nakashio, T., Kasai, Y., Nonami, T., Nakao, A., Takagi, H., and Kannagi, R. (1998). Involvement of adhesion molecules in metastasis of SW1990, human pancreatic cancer cells. *J. Surg. Oncol.* *67*, 77-84.

Huang, J., Behrens, C., Wistuba, I.I., Gazdar, A.F., and Jagirdar, J. (2002). Clonality of combined tumors. *Arch. Pathol. Lab Med.* *126*, 437-441.

Ito, K., Ye, C.L., Hibi, K., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Hidemura, K., Ando, H., Kasai, Y., Akiyama, S., and Nakao, A. (2001). Paired tumor marker of soluble E-selectin and its ligand sialyl Lewis A in colorectal cancer. *J. Gastroenterol.* *36*, 823-829.

Javle, M.M., Tan, D., Yu, J., LeVea, C.M., Li, F., Kuvshinoff, B.W., and Gibbs, J.F. (2004). Nuclear survivin expression predicts poor outcome in cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology* *51*, 1653-1657.

Jemal, A., Tiwari, R.C., Murray, T., Ghafour, A., Samuels, A., Ward, E., Feuer, E.J., and Thun, M.J. (2004). Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J. Clin.* *54*, 8-29.

Jin, Y., Wei, Y., Xiong, L., Yang, Y., and Wu, J.R. (2005). Differential regulation of survivin by p53 contributes to cell cycle dependent apoptosis. *Cell Res.* *15*, 361-370.

Johnson, D.G. and Walker, C.L. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *39*:295-312., 295-312.

Johnson, L.R. (1988). Regulation of gastrointestinal mucosal growth. *Physiol Rev.* *68*, 456-502.

Junck, L., Olson, J.M., Ciliax, B.J., Koeppe, R.A., Watkins, G.L., Jewett, D.M., McKeever, P.E., Wieland, D.M., Kilbourn, M.R., Starosta-Rubinstein, S., and . (1989). PET imaging of human gliomas with ligands for the peripheral benzodiazepine binding site. *Ann. Neurol.* *26*, 752-758.

Kaelin, W.G., Jr. (1999). Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays.* *21*, 950-958.

Kakiuchi, Y., Tsuji, S., Tsujii, M., Murata, H., Kawai, N., Yasumaru, M., Kimura, A., Komori, M., Irie, T., Miyoshi, E., Sasaki, Y., Hayashi, N., Kawano, S., and Hori, M. (2002). Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer Res.* *62*, 1567-1572.

Kallio,M.J., Nieminen,M., and Eriksson,J.E. (2001). Human inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin participates in regulation of chromosome segregation and mitotic exit. *FASEB J.* 15, 2721-2723.

Kato,J., Kuwabara,Y., Mitani,M., Shinoda,N., Sato,A., Toyama,T., Mitsui,A., Nishiwaki,T., Moriyama,S., Kudo,J., and Fujii,Y. (2001). Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy. *Int. J. Cancer* 20;95, 92-95.

Katz,Y., Eitan,A., Amiri,Z., and Gavish,M. (1988). Dramatic increase in peripheral benzodiazepine binding sites in human colonic adenocarcinoma as compared to normal colon. *Eur. J. Pharmacol.* 148, 483-484.

Katz,Y., Eitan,A., and Gavish,M. (1990). Increase in peripheral benzodiazepine binding sites in colonic adenocarcinoma. *Oncology* 47, 139-142.

Kawasaki,H., Altieri,D.C., Lu,C.D., Toyoda,M., Tenjo,T., and Tanigawa,N. (1998). Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58, 5071-5074.

Kennedy,S.M., O'Driscoll,L., Purcell,R., Fitz-Simons,N., McDermott,E.W., Hill,A.D., O'Higgins,N.J., Parkinson,M., Linehan,R., and Clynes,M. (2003). Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br. J. Cancer* 88, 1077-1083.

Kerr,J.F., Wyllie,A.H., and Currie,A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 26, 239-257.

Kessel,D., Antolovich,M., and Smith,K.M. (2001). The role of the peripheral benzodiazepine receptor in the apoptotic response to photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 74, 346-349.

Keyomarsi,K. and Herliczek,T.W. (1997). The role of cyclin E in cell proliferation, development and cancer. *Prog. Cell Cycle Res.* 3, 171-191.

Kim,E.H., Kim,H.S., Kim,S.U., Noh,E.J., Lee,J.S., and Choi,K.S. (2005). Sodium butyrate sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis through inhibition of Cdc2 and the subsequent downregulation of survivin and XIAP. *Oncogene* 24, 6877-6889

Kinzler,K.W. and Vogelstein,B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.

Kobayashi,K., Matsumoto,S., Morishima,T., Kawabe,T., and Okamoto,T. (2000). Cimetidine inhibits cancer cell adhesion to endothelial cells and prevents metastasis by blocking E-selectin expression. *Cancer Res.* 60, 3978-3984.

Kouvaraki,M.A., Ajani,J.A., Hoff,P., Wolff,R., Evans,D.B., Lozano,R., and Yao,J.C. (2004). Fluorouracil, doxorubicin, and streptozocin in the treatment of patients with locally advanced and metastatic pancreatic endocrine carcinomas. *J. Clin. Oncol.* 22, 4762-4771.

Kozikowski,A.P., Ma,D., Brewer,J., Sun,S., Costa,E., Romeo,E., and Guidotti,A. (1993). Chemistry, binding affinities, and behavioral properties of a new class of "antineoplastic" mitochondrial DBI receptor complex (mDRC) ligands. *J. Med. Chem.* 36, 2908-2920.

- Krieg,A., Mahotka,C., Krieg,T., Grabsch,H., Muller,W., Takeno,S., Suschek,C.V., Heydthausen,M., Gabbert,H.E., and Gerharz,C.D. (2002). Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *Br. J. Cancer* 86, 737-743.
- Krueger,K.E. (1995). Molecular and functional properties of mitochondrial benzodiazepine receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 453-470.
- Kupczyk-Subotkowska,L., Siahaan,T.J., Basile,A.S., Friedman,H.S., Higgins,P.E., Song,D., and Gallo,J.M. (1997). Modulation of melphalan resistance in glioma cells with a peripheral benzodiazepine receptor ligand-melphalan conjugate. *J. Med. Chem.* 40, 1726-1730.
- Kwekkeboom,D.J., De Herder,W.W., Kam,B.L., van Eijck,C.H., van Essen,M., Kooij,P.P., Feelders,R.A., van Aken,M.O., and Krenning,E.P. (2008). Treatment with the radiolabeled somatostatin analog [177 Lu-DOTA 0,Tyr3]octreotate: toxicity, efficacy, and survival. *J. Clin. Oncol.* 26, 2124-2130.
- LaCasse,E.C., Baird,S., Korneluk,R.G., and MacKenzie,A.E. (1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17, 3247-3259.
- Landau,M., Weizman,A., Zoref-Shani,E., Beery,E., Wasseman,L., Landau,O., Gavish,M., Brenner,S., and Nordenberg,J. (1998). Antiproliferative and differentiating effects of benzodiazepine receptor ligands on B16 melanoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 56, 1029-1034.
- Larochette,N., Decaudin,D., Jacotot,E., Brenner,C., Marzo,I., Susin,S.A., Zamzami,N., Xie,Z., Reed,J., and Kroemer,G. (1999). Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Exp. Cell Res.* 249, 413-421.
- Latulippe, E. and Klimstra, D. (2001). Retinoblastoma (Rb) protein expression in colorectal high grade neuroendocrine carcinoma. *Mod.Pathol.* 14, 89A.
- Lee,C.S. (1996). Lack of p53 immunoreactivity in pancreatic endocrine tumors. *Pathology.* 28, 139-141.
- Lee,S. and Schmitt,C.A. (2003). Chemotherapy response and resistance. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 90-96.
- Leotlela,P.D., Jauch,A., Holtgreve-Grez,H., and Thakker,R.V. (2003). Genetics of neuroendocrine and carcinoid tumours. *Endocr. Relat Cancer* 10, 437-450.
- Li,F., Ackermann,E.J., Bennett,C.F., Rothermel,A.L., Plescia,J., Tognin,S., Villa,A., Marchisio,P.C., and Altieri,D.C. (1999). Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat. Cell Biol.* 1, 461-466.
- Li,F., Ambrosini,G., Chu,E.Y., Plescia,J., Tognin,S., Marchisio,P.C., and Altieri,D.C. (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396, 580-584.
- Li,F. and Ling,X. (2006). Survivin study: An update of "What is the next wave?". *J. Cell Physiol.* 208, 476-86.

- Lohmann,D.R., Funk,A., Niedermeyer,H.P., Haupel,S., and Hofler,H. (1993). Identification of p53 gene mutations in gastrointestinal and pancreatic carcinoids by nonradioisotopic SSSA. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 64, 293-296.
- Lordick,F., Ott,K., Krause,B.J., Weber,W.A., Becker,K., Stein,H.J., Lorenzen,S., Schuster,T., Wieder,H., Herrmann,K., Breidenkamp,R., Hofler,H., Fink,U., Peschel,C., Schwaiger,M., and Siewert,J.R. (2007). PET to assess early metabolic response and to guide treatment of adenocarcinoma of the oesophagogastric junction: the MUNICON phase II trial. *Lancet Oncol.* 8, 797-805.
- Lorenzen,S., Schuster,T., Porschen,R., Al Batran,S.E., Hofheinz,R., Thuss-Patience,P., Moehler,M., Grabowski,P., Arnold,D., Greten,T., Muller,L., Rothling,N., Peschel,C., Langer,R., and Lordick,F. (2009). Cetuximab plus cisplatin-5-fluorouracil versus cisplatin-5-fluorouracil alone in first-line metastatic squamous cell carcinoma of the esophagus: a randomized phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie. *Ann. Oncol.* 20, 1667-1673.
- Lu,B., Gonzalez,A., Massion,P.P., Shyr,Y., Shaktour,B., Carbone,D.P., and Hallahan,D.E. (2004). Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer. *Br. J. Cancer* 91, 537-540.
- Lubomierski,N., Kersting,M., Bert,T., Muench,K., Wulbrand,U., Schuermann,M., Bartsch,D., and Simon,B. (2001). Tumor suppressor genes in the 9p21 gene cluster are selective targets of inactivation in neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors. *Cancer Res.* 61, 5905-5910.
- Ma,X., Wang,S., Zhou,J., Xing,H., Xu,G., Wang,B., Chen,G., Lu,Y.P., and Ma,D. (2005). Induction of apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells by antisurvivin oligonucleotides. *Oncol. Rep.* 14, 275-279.
- Maaser,K., Grabowski,P., Sutter,A.P., Höpfner,M., Foss,H.D., Stein,H., Berger,G., Gavish,M., Zeitz,M., and Scherübl,H. (2002). Overexpression of the peripheral benzodiazepine receptor is a relevant prognostic factor in stage III colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 8, 3205-3209.
- Mahotka,C., Krieg,T., Krieg,A., Wenzel,M., Suschek,C.V., Heydthausen,M., Gabbert,H.E., and Gerharz,C.D. (2002a). Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *Int. J. Cancer* 100, 30-36.
- Mahotka,C., Liebmann,J., Wenzel,M., Suschek,C.V., Schmitt,M., Gabbert,H.E., and Gerharz,C.D. (2002b). Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. *Cell Death. Differ.* 9, 1334-1342.
- Mahotka,C., Wenzel,M., Springer,E., Gabbert,H.E., and Gerharz,C.D. (1999). Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer Res.* 59, 6097-6102.
- Marchetti,P., Castedo,M., Susin,S.A., Zamzami,N., Hirsch,T., Macho,A., Haeffner,A., Hirsch,F., Geuskens,M., and Kroemer,G. (1996a). Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J. Exp. Med.* 184, 1155-1160.

Marchetti,P., Trincavelli,L., Giannarelli,R., Giusti,L., Coppelli,A., Martini,C., Navalesi,R., and Lucacchini,A. (1996b). Characterization of peripheral benzodiazepine receptors in purified large mammal pancreatic islets. *Biochem. Pharmacol.* *51*, 1437-1442.

Martinez,A., Bellosillo,B., Bosch,F., Ferrer,A., Marce,S., Villamor,N., Ott,G., Montserrat,E., Campo,E., and Colomer,D. (2004). Nuclear survivin expression in mantle cell lymphoma is associated with cell proliferation and survival. *Am. J. Pathol.* *164*, 501-510.

Matsuura,N., Narita,T., Mitsuoka,C., Kimura,N., Kannagi,R., Imai,T., Funahashi,H., and Takagi,H. (1997). Increased level of circulating adhesion molecules in the sera of breast cancer patients with distant metastases. *Jpn. J. Clin. Oncol.* *27*, 135-139.

Mega,S., Miyamoto,M., Li,L., Kadoya,M., Takahashi,R., Hase,R., Kaneko,H., Shichinohe,T., Kawarada,Y., Itoh,T., Morikawa,T., and Kondo,S. (2006). Immunohistochemical analysis of nuclear survivin expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Dis. Esophagus.* *19*, 355-359.

Meier,P., Finch,A., and Evan,G. (2000). Apoptosis in development. *Nature.* *407*, 796-801.

Miettinen,H., Kononen,J., Haapasalo,H., Helen,P., Sallinen,P., Harjuntausta,T., Helin,H., and Alho,H. (1995). Expression of peripheral-type benzodiazepine receptor and diazepam binding inhibitor in human astrocytomas: relationship to cell proliferation. *Cancer Res.* *55*, 2691-2695.

Mills,S.E., Allen,M.S., Jr., and Cohen,A.R. (1983). Small-cell undifferentiated carcinoma of the colon. A clinicopathological study of five cases and their association with colonic adenomas. *Am. J. Surg. Pathol.* *7*, 643-651.

Mirza,A., McGuirk,M., Hockenberry,T.N., Wu,Q., Ashar,H., Black,S., Wen,S.F., Wang,L., Kirschmeier,P., Bishop,W.R., Nielsen,L.L., Pickett,C.B., and Liu,S. (2002). Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* *21*, 2613-2622.

Mitry,E. and Rougier,P. (2001). The treatment of undifferentiated neuroendocrine tumors. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* *37*, 47-51.

Miyachi,K., Sasaki,K., Onodera,S., Taguchi,T., Nagamachi,M., Kaneko,H., and Sunagawa,M. (2003). Correlation between survivin mRNA expression and lymph node metastasis in gastric cancer. *Gastric. Cancer* *6*, 217-224.

Modlin,I.M., Oberg,K., Chung,D.C., Jensen,R.T., De Herder,W.W., Thakker,R.V., Caplin,M., Delle,F.G., Kaltsas,G.A., Krenning,E.P., Moss,S.F., Nilsson,O., Rindi,G., Salazar,R., Ruzsiewski,P., and Sundin,A. (2008). Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Lancet Oncol.* *9*, 61-72.

Moertel,C.G., Fleming,T.R., Macdonald,J.S., Haller,D.G., Laurie,J.A., Goodman,P.J., Ungerleider,J.S., Emerson,W.A., Tormey,D.C., Glick,J.H., and . (1990). Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N. Engl. J. Med.* *322*, 352-358.

Moertel,C.G., Fleming,T.R., Macdonald,J.S., Haller,D.G., Laurie,J.A., Tangen,C.M., Ungerleider,J.S., Emerson,W.A., Tormey,D.C., Glick,J.H., and . (1995). Fluorouracil plus

levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Ann. Intern. Med.* 122, 321-326.

Montesano,R., Hollstein,M., and Hainaut,P. (1996). Molecular etiopathogenesis of esophageal cancers. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 32, 73-84.

Moore,M.J., Goldstein,D., Hamm,J., Figer,A., Hecht,J.R., Gallinger,S., Au,H.J., Murawa,P., Walde,D., Wolff,R.A., Campos,D., Lim,R., Ding,K., Clark,G., Voskoglou-Nomikos,T., Ptasynski,M., and Parulekar,W. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol* 25, 1960-1966.

Moore,P.S., Missiaglia,E., Antonello,D., Zamo,A., Zamboni,G., Corleto,V., Falconi,M., and Scarpa,A. (2001). Role of disease-causing genes in sporadic pancreatic endocrine tumors: MEN1 and VHL. *Genes Chromosomes. Cancer* 32, 177-181.

Munkholm,P. (2003). Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 18 *Suppl 2:1-5.*, 1-5.

Munro,J.M., Lo,S.K., Corless,C., Robertson,M.J., Lee,N.C., Barnhill,R.L., Weinberg,D.S., and Bevilacqua,M.P. (1992). Expression of sialyl-Lewis X, an E-selectin ligand, in inflammation, immune processes, and lymphoid tissues. *Am. J. Pathol.* 141, 1397-1408.

Musacchio,T., Laquintana,V., Latrofa,A., Trapani,G., Torchilin,VP. (2009). PEG-PE micelles loaded with paclitaxel and surface-modified by a PBR-ligand: synergistic anticancer effect. *Mol Pharm.* 6, 468-79.

Muscarella,P., Melvin,W.S., Fisher,W.E., Foor,J., Ellison,E.C., Herman,J.G., Schirmer,W.J., Hitchcock,C.L., DeYoung,B.R., and Weghorst,C.M. (1998). Genetic alterations in gastrinomas and nonfunctioning pancreatic neuroendocrine tumors: an analysis of p16/MTS1 tumor suppressor gene inactivation. *Cancer Res.* 58, 237-240.

Muzio,L.L., Farina,A., Rubini,C., Pezzetti,F., Stabellini,G., Laino,G., Santarelli,A., Pannone,G., Bufo,P., Lillo,A., and Carinci,F. (2005). Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Lett.* 225, 27-33.

Nakagawa,Y., Yamaguchi,S., Hasegawa,M., Nemoto,T., Inoue,M., Suzuki,K., Hirokawa,K., and Kitagawa,M. (2004). Differential expression of survivin in bone marrow cells from patients with acute lymphocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Leuk. Res.* 28, 487-494.

Nakashio,T., Narita,T., Sato,M., Akiyama,S., Kasai,Y., Fujiwara,M., Ito,K., Takagi,H., and Kannagi,R. (1997). The association of metastasis with the expression of adhesion molecules in cell lines derived from human gastric cancer. *Anticancer Res.* 17, 293-299.

Nakayama,T., Watanabe,M., Katsumata,T., Teramoto,T., and Kitajima,M. (1995). Expression of sialyl Lewis(a) as a new prognostic factor for patients with advanced colorectal carcinoma. *Cancer.* 75, 2051-2056.

Neary,J.T., Jorgensen,S.L., Oracion,A.M., Bruce,J.H., and Norenberg,M.D. (1995). Inhibition of growth factor-induced DNA synthesis in astrocytes by ligands of peripheral-type benzodiazepine receptors. *Brain Res.* 675, 27-30.

- Newsham,G. (1998). HIV neuropathy treated with gabapentin. *AIDS* 12, 219-221.
- Nishiwaki,Y., Yokota,T., Hiraoka,M., Miyagishi,M., Taira,K., Isobe,M., Mizusawa,H., and Yoshida,M. (2003). Introduction of short interfering RNA to silence endogenous E-selectin in vascular endothelium leads to successful inhibition of leukocyte adhesion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310, 1062-1066.
- O'Connell,J.B., Maggard,M.A., and Ko,C.Y. (2004). Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1420-1425.
- O'Connor,D.S., Grossman,D., Plescia,J., Li,F., Zhang,H., Villa,A., Tognin,S., Marchisio,P.C., and Altieri,D.C. (2000a). Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 13103-13107.
- O'Connor,D.S., Schechner,J.S., Adida,C., Mesri,M., Rothermel,A.L., Li,F., Nath,A.K., Pober,J.S., and Altieri,D.C. (2000b). Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 156, 393-398.
- O'Connor,D.S., Wall,N.R., Porter,A.C., and Altieri,D.C. (2002). A p34(cdc2) survival checkpoint in cancer. *Cancer Cell* 2, 43-54.
- O'Dowd,G. and Gosney,J.R. (1995). Absence of overexpression of p53 protein by intestinal carcinoid tumours. *J. Pathol.* 175, 403-404.
- O'Toole,D., Grossman,A., Gross,D., Delle,F.G., Barkmanova,J., O'Connor,J., Pape,U.F., and Plockinger,U. (2009). ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: biochemical markers. *Neuroendocrinology.* 90, 194-202.
- Öberg,K. (2001). Chemotherapy and biotherapy in the treatment of neuroendocrine tumours. *Ann. Oncol.* 12 *Suppl* 2, S111-S114.
- Oda,E., Ohki,R., Murasawa,H., Nemoto,J., Shibue,T., Yamashita,T., Tokino,T., Taniguchi,T., and Tanaka,N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 288, 1053-1058.
- Okada,E., Murai,Y., Matsui,K., Isizawa,S., Cheng,C., Masuda,M., and Takano,Y. (2001). Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer Lett.* 163, 109-116.
- Paduano,F., Villa,R., Pennati,M., Folini,M., Binda,M., Daidone,M.G., and Zaffaroni,N. (2006). Silencing of survivin gene by small interfering RNAs produces supra-additive growth suppression in combination with 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in human prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 5, 179-186.
- Papadopoulos,V., Amri,H., Boujrad,N., Cascio,C., Culty,M., Garnier,M., Hardwick,M., Li,H., Vidic,B., Brown,A.S., Reversa,J.L., Bernassau,J.M., and Drieu,K. (1997). Peripheral benzodiazepine receptor in cholesterol transport and steroidogenesis. *Steroids.* 62, 21-28.
- Papadopoulos,V., Kapsis,A., Li,H., Amri,H., Hardwick,M., Culty,M., Kasprzyk,P.G., Carlson,M., Moreau,J.P., and Drieu,K. (2000). Drug-induced inhibition of the peripheral-type benzodiazepine receptor expression and cell proliferation in human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 20, 2835-2847.

- Pape,U.F., Jann,H., Muller-Nordhorn,J., Bockelbrink,A., Berndt,U., Willich,S.N., Koch,M., Rocken,C., Rindi,G., and Wiedenmann,B. (2008). Prognostic relevance of a novel TNM classification system for upper gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer*. *113*, 256-265.
- Pappata,S., Cornu,P., Samson,Y., Prenant,C., Benavides,J., Scatton,B., Crouzel,C., Hauw,J.J., and Syrota,A. (1991). PET study of carbon-11-PK 11195 binding to peripheral type benzodiazepine sites in glioblastoma: a case report. *J. Nucl. Med.* *32*, 1608-1610.
- Pawlikowski,M., Kunert-Radek,J., Radek,A., and Stepien,H. (1988). Inhibition of cell proliferation of human gliomas by benzodiazepines in vitro. *Acta Neurol. Scand.* *77*, 231-233.
- Pennati,M., Binda,M., Colella,G., Zoppe',M., Folini,M., Vignati,S., Valentini,A., Citti,L., De Cesare,M., Pratesi,G., Giacca,M., Daidone,M.G., and Zaffaroni,N. (2004a). Ribozyme-mediated inhibition of survivin expression increases spontaneous and drug-induced apoptosis and decreases the tumorigenic potential of human prostate cancer cells. *Oncogene* *23*, 386-394.
- Pennati,M., Binda,M., De Cesare,M., Pratesi,G., Folini,M., Citti,L., Daidone,M.G., Zunino,F., and Zaffaroni,N. (2004b). Ribozyme-mediated down-regulation of survivin expression sensitizes human melanoma cells to topotecan in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* *25*, 1129-1136.
- Plantaz,D., Mohapatra,G., Matthay,K.K., Pellarin,M., Seeger,R.C., and Feuerstein,B.G. (1997). Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Am. J. Pathol.* *150*, 81-89.
- Ravagnan,L., Marzo,I., Costantini,P., Susin,S.A., Zamzami,N., Petit,P.X., Hirsch,F., Goulbern,M., Poupon,M.F., Miccoli,L., Xie,Z., Reed,J.C., and Kroemer,G. (1999). Lonidamine triggers apoptosis via a direct, Bcl-2-inhibited effect on the mitochondrial permeability transition pore. *Oncogene*. *18*, 2537-2546.
- Rindi,G., Klöppel,G., Alhman,H., Caplin,M., Couvelard,A., De Herder,W.W., Eriksson,B., Falchetti,A., Falconi,M., Komminoth,P., Korner,M., Lopes,J.M., McNicol,A.M., Nilsson,O., Perren,A., Scarpa,A., Scoazec,J.Y., and Wiedenmann,B. (2006). TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch.* *449*, 395-401.
- Rindi,G., Klöppel,G., Couvelard,A., Komminoth,P., Korner,M., Lopes,J.M., McNicol,A.M., Nilsson,O., Perren,A., Scarpa,A., Scoazec,J.Y., and Wiedenmann,B. (2007). TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch.* *451*, 757-762.
- Rindi,G., Villanacci,V., and Ubiali,A. (2000). Biological and molecular aspects of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Digestion*. *62 Suppl 1*,19-26.
- Rinke,A., Muller,H.H., Schade-Brittinger,C., Klose,K.J., Barth,P., Wied,M., Mayer,C., Aminossadati,B., Pape,U.F., Bläker,M., Harder,J., Arnold,C., Gress,T., and Arnold,R. (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*, 4656-4663.

- Robert Koch- Insitut. Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2008
- Röcken,C., Neumann,U., and Ebert,M.P. (2008). [New approaches to early detection, estimation of prognosis and therapy for malignant tumours of the gastrointestinal tract]. *Z. Gastroenterol.* *46*, 216-222.
- Rodel,F., Hoffmann,J., Distel,L., Herrmann,M., Noisternig,T., Papadopoulos,T., Sauer,R., and Rodel,C. (2005). Survivin as a radioresistance factor, and prognostic and therapeutic target for radiotherapy in rectal cancer. *Cancer Res.* *65*, 4881-4887.
- Roussel,M.F. (1999). The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene.* *18*, 5311-5317.
- Roux,P.P. and Blenis,J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *68*, 320-344.
- Sagol,O., Yavuzsen,T., Oztop,I., Ulukus,C., Ylmaz,U., Alakavuklar,M., Karademir,S., Obuz,F., Astaroglu,H., and Astaroglu,I. (2005). The effect of apoptotic activity, survivin, Ki-67, and P-glycoprotein expression on prognosis in pancreatic carcinoma. *Pancreas* *30*, 343-348.
- Sampietro,G., Tomasic,G., Collini,P., Biganzoli,E., Boracchi,P., Bidoli,P., and Pilotti,S. (2000). Gene product immunophenotyping of neuroendocrine lung tumors. No linking evidence between carcinoids and small-cell lung carcinomas suggested by multivariate statistical analysis. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* *8*, 49-56.
- Sartelet,H., Decaussin,M., Devouassoux,G., Nawrocki-Raby,B., Brichon,P.Y., Brambilla,C., and Brambilla,E. (2004). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (VEGF-R1 [Flt-1] and VEGF-R2 [KDR/Flk-1]) in tumorlets and in neuroendocrine cell hyperplasia of the lung. *Hum. Pathol.* *35*, 1210-1217.
- Satoh,T., Okamoto,I., Miyazaki,M., Morinaga,R., Tsuya,A., Hasegawa,Y., Terashima,M., Ueda,S., Fukuoka,M., Ariyoshi,Y., Saito,T., Masuda,N., Watanabe,H., Taguchi,T., Kakihara,T., Aoyama,Y., Hashimoto,Y., and Nakagawa,K. (2009). Phase I study of YM155, a novel survivin suppressant, in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* *15*, 3872-3880.
- Sauter,G., Lee,J., Bartlett,J.M.S., Slamon,D.J., and Press,M.F. (2009). Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J. Clin. Oncol.* *27*, 1323-1333.
- Schmiegel,W., Reinacher-Schick,A., Arnold,D., Graeven,U., Heinemann,V., Porschen,R., Riemann,J., Rodel,C., Sauer,R., Wieser,M., Schmitt,W., Schmoll,H.J., Seufferlein,T., Kopp,I., and Pox,C. (2008). Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008. *Z. Gastroenterol.* *46*, 799-840.
- Schmitt-Gräff,A., Muller,H., Rancso,C., Ahnert-Hilger,G., John,M., Riecken,E.O., Stein,H., and Wiedenmann,B. (1997). Molecules of regulated secretion are differentiation markers of neuroendocrine tumors. *Verh. Dtsch. Ges. Pathol.* *81*, 157-161.

- Schonhoff,S.E., Giel-Moloney,M. and Leiter,A.B. (2004). Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* 145, 2639-2644.
- Schuler,M. and Green,D.R. (2005). Transcription, apoptosis and p53: catch-22. *Trends Genet.* 21, 182-187.
- Selivanova,G. (2004). p53: fighting cancer. *Curr. Cancer Drug Targets.* 4, 385-402.
- Serrano,J., Goebel,S.U., Peghini,P.L., Lubensky,I.A., Gibril,F., and Jensen,R.T. (2000). Alterations in the p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor gene in gastrinomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 85, 4146-4156.
- Shaheen,N. and Ransohoff,D.F. (2002). Gastroesophageal reflux, Barrett esophagus, and esophageal cancer: clinical applications. *JAMA.* 287, 1982-1986.
- Sherr,C.J. and Roberts,J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501-1512.
- Shimizu,S., Narita,M., and Tsujimoto,Y. (1999). Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 399, 483-487.
- Shinohara,E.T., Gonzalez,A., Massion,P.P., Chen,H., Li,M., Freyer,A.S., Olson,S.J., Andersen,J.J., Shyr,Y., Carbone,D.P., Johnson,D.H., Hallahan,D.E., and Lu,B. (2005). Nuclear survivin predicts recurrence and poor survival in patients with resected nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 103, 1685-1692.
- Slee,E.A., O'Connor,D.J., and Lu,X. (2004). To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene.* 23, 2809-2818.
- Solcia E, Klöppel G, and Sobin L.H. *Histological typing of endocrine tumours. Second Edition.* 2000. Springer. WHO international histological classification of tumours.
- Stein,U., Walther,W., Arlt,F., Schwabe,H., Smith,J., Fichtner,I., Birchmeier,W., and Schlag,P.M. (2009). MACC1, a newly identified key regulator of HGF-MET signaling, predicts colon cancer metastasis. *Nat. Med.* 15, 59-67.
- Stoebner,P.E., Carayon,P., Casellas,P., Portier,M., Lavabre-Bertrand,T., Cuq,P., Cano,J.P., Meynadier,J., and Meunier,L. (2001). Transient protection by peripheral benzodiazepine receptors during the early events of ultraviolet light-induced apoptosis. *Cell Death. Differ.* 8, 747-753.
- Stroobants S., Goeminne J., Seegers M., Dimitrijevic S., Dupont P., Nuyts J., Martens M., van den Borne B., Cole P., Sciot R., Dumez H., Silberman S., Mortelmans L. and van Oosterom A. (2003). 18FDG-Positron emission tomography for the early prediction of response in advanced soft tissue sarcoma treated with imatinib mesylate (Glivec). *Eur J Cancer* 39, 2012-2020.
- Sturm,I., Köhne,C.H., Wolff,G., Petrowsky,H., Hillebrand,T., Hauptmann,S., Lorenz,M., Dörken,B., and Daniel,P.T. (1999). Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J. Clin. Oncol.* 17, 1364-1374.

- Sturm,I., Petrowsky,H., Volz,R., Lorenz,M., Radetzki,S., Hillebrand,T., Wolff,G., Hauptmann,S., Dörken,B., and Daniel,P.T. (2001). Analysis of p53/BAX/p16 (ink4a/CDKN2) in esophageal squamous cell carcinoma: high BAX and p16 (ink4a/CDKN2) identifies patients with good prognosis. *J. Clin. Oncol.* *19*, 2272-2281.
- Suerbaum,S. and Michetti,P. (2002). Helicobacter pylori infection. *N. Engl. J. Med.* *347*, 1175-1186.
- Sutter,A.P., Maaser,K., Barthel,B., and Scherübl,H. (2003). Ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in oesophageal cancer cells: involvement of the p38MAPK signalling pathway. *Br. J. Cancer* *89*, 564-572.
- Sutter,A.P., Maaser,K., Gerst,B., Krahn,A., Zeitz,M., and Scherübl,H. (2004). Enhancement of peripheral benzodiazepine receptor ligand-induced apoptosis and cell cycle arrest of esophageal cancer cells by simultaneous inhibition of MAPK/ERK kinase. *Biochem. Pharmacol.* *67*, 1701-1710.
- Tamrakar,S., Rubin,E., and Ludlow,J.W. (2000). Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Front Biosci.* *5*, D121-D137.
- Tanaka,K., Iwamoto,S., Gon,G., Nohara,T., Iwamoto,M., and Tanigawa,N. (2000). Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin. Cancer Res.* *6*, 127-134.
- Tanimoto,Y., Onishi,Y., Sato,Y., and Kizaki,H. (1999). Benzodiazepine receptor agonists modulate thymocyte apoptosis through reduction of the mitochondrial transmembrane potential. *Jpn. J. Pharmacol.* *79*, 177-183.
- Taylor,W.R. and Stark,G.R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene.* *20*, 1803-1815.
- Tischoff,I. and Tannapfel,A. (2008). Epigenetic alterations in colorectal carcinomas and precancerous lesions. *Z. Gastroenterol.* *46*, 1202-1206.
- Tonini,G., Vincenzi,B., Santini,D., Scarpa,S., Vasaturo,T., Malacrino,C., Coppola,R., Magistrelli,P., Borzomati,D., Baldi,A., Antinori,A., Caricato,M., Nuzzo,G., and Picciocchi,A. (2005). Nuclear and cytoplasmic expression of survivin in 67 surgically resected pancreatic cancer patients. *Br. J. Cancer* *92*, 2225-2232.
- Torres,S.R., Nardi,G.M., Ferrara,P., Ribeiro-do-Valle,R.M., and Farges,R.C. (1999). Potential role of peripheral benzodiazepine receptors in inflammatory responses. *Eur. J. Pharmacol.* *385*, R1-R2.
- Ubiali,A., Benetti,A., Papotti,M., Villanacci,V., and Rindi,G. (2001). Genetic alterations in poorly differentiated endocrine colon carcinomas developing in tubulo-villous adenomas: a report of two cases. *Virchows Arch.* *439*, 776-781.
- Uematsu,M., Ohsawa,I., Aokage,T., Nishimaki,K., Matsumoto,K., Takahashi,H., Asoh,S., Teramoto,A., and Ohta,S. (2005). Prognostic significance of the immunohistochemical index of survivin in glioma: a comparative study with the MIB-1 index. *J. Neurooncol.* *72*, 231-238.

- Uren,A.G., Wong,L., Pakusch,M., Fowler,K.J., Burrows,F.J., Vaux,D.L., and Choo,K.H. (2000). Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr. Biol.* *10*, 1319-1328.
- Van Cutsem,E., Köhne,C.H., Hitre,E., Zaluski,J., Chang Chien,C.R., Makhson,A., D'Haens,G., Pinter,T., Lim,R., Bodoky,G., Roh,J.K., Folprecht,G., Ruff,P., Stroh,C., Tejpar,S., Schlichting,M., Nippgen,J., and Rougier,P. (2009). Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1408-1417.
- Veenman,L., Shandalov,Y., and Gavish,M. (2008). VDAC activation by the 18 kDa translocator protein (TSPO), implications for apoptosis. *J Bioenerg Biomembr.* *40*, 199-205.
- Venturini,I., Zeneroli,M.L., Corsi,L., Avallone,R., Farina,F., Alho,H., Baraldi,C., Ferrarese,C., Pecora,N., Frigo,M., Ardizzone,G., Arrigo,A., Pellicci,R., and Baraldi,M. (1998). Up-regulation of peripheral benzodiazepine receptor system in hepatocellular carcinoma. *Life Sci.* *63*, 1269-1280.
- Verma,A. and Snyder,S.H. (1989). Peripheral type benzodiazepine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *29*, 307-322.
- Vidal,A. and Koff,A. (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* *247*, 1-15.
- Vitale,L., Lenzi,L., Huntsman,S.A., Canaider,S., Frabetti,F., Casadei,R., Facchin,F., Carinci,P., Zannotti,M., Coppola,D., and Strippoli,P. (2006). Differential expression of alternatively spliced mRNA forms of the insulin-like growth factor 1 receptor in human neuroendocrine tumors. *Oncol. Rep.* *15*, 1249-1256.
- Von Haefen,C., Wieder,T., Essmann,F., Schulze-Osthoff,K., Dörken,B., and Daniel,P.T. (2003). Paclitaxel-induced apoptosis in BJAB cells proceeds via a death receptor-independent, caspases-3/-8-driven mitochondrial amplification loop. *Oncogene.* *22*, 2236-2247.
- Vortmeyer,A.O., Lubensky,I.A., Merino,M.J., Wang,C.Y., Pham,T., Furth,E.E., and Zhuang,Z. (1997). Concordance of genetic alterations in poorly differentiated colorectal neuroendocrine carcinomas and associated adenocarcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* *89*, 1448-1453.
- Vousden,K.H. and Lu,X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer.* *2*, 594-604.
- Vousden,K.H. and Prives,C. (2005). P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell.* *120*, 7-10.
- Wang,D.G., Johnston,C.F., and Buchanan,K.D. (1997). Oncogene expression in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: implications for pathogenesis. *Cancer* *80*, 668-675.
- Wang,J.K., Morgan,J.I., and Spector,S. (1984). Benzodiazepines that bind at peripheral sites inhibit cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 753-756.

- Wang,L., Zhang,G.M., and Feng,Z.H. (2003). Down-regulation of survivin expression reversed multidrug resistance in adriamycin-resistant HL-60/ADR cell line. *Acta Pharmacol. Sin.* 24, 1235-1240.
- Weikert,S., Christoph,F., Schrader,M., Krause,H., Miller,K., and Muller,M. (2005). Quantitative analysis of survivin mRNA expression in urine and tumor tissue of bladder cancer patients and its potential relevance for disease detection and prognosis. *Int. J. Cancer* 116, 100-104.
- Weston,B.W., Hiller,K.M., Mayben,J.P., Manousos,G.A., Bendt,K.M., Liu,R., and Cusack,J.C., Jr. (1999). Expression of human alpha(1,3)fucosyltransferase antisense sequences inhibits selectin-mediated adhesion and liver metastasis of colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 59, 2127-2135.
- Wieder,T., Essmann,F., Prokop,A., Schmelz,K., Schulze-Osthoff,K., Beyaert,R., Dorken,B., and Daniel,P.T. (2001). Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood.* 97, 1378-1387.
- Williams E.D. and Sandler M. The Classification of carcinoid tumours. *Lancet* , 238-239. 1963.
- Wyllie,A.H., Bellamy,C.O., Bubb,V.J., Clarke,A.R., Corbet,S., Curtis,L., Harrison,D.J., Hooper,M.L., Toft,N., Webb,S., and Bird,C.C. (1999). Apoptosis and carcinogenesis. *Br. J. Cancer.* 80 *Suppl 1*, 34-37.
- Xia,W., Spector,S., Hardy,L., Zhao,S., Saluk,A., Alemame,L., and Spector,N.L. (2000). Tumor selective G2/M cell cycle arrest and apoptosis of epithelial and hematological malignancies by BBL22, a benzazepine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 7494-7499.
- Yang,D., Welm,A., and Bishop,J.M. (2004). Cell division and cell survival in the absence of survivin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 15100-15105.
- Yao,J.C., Phan,A., Hoff,P.M., Chen,H.X., Charnsangavej,C., Yeung,S.C., Hess,K., Ng,C., Abbruzzese,J.L., and Ajani,J.A. (2008). Targeting vascular endothelial growth factor in advanced carcinoid tumor: a random assignment phase II study of depot octreotide with bevacizumab and pegylated interferon alpha-2b. *J. Clin. Oncol.* 26, 1316-1323.
- Zaffaroni,N., Pennati,M., Colella,G., Perego,P., Supino,R., Gatti,L., Pilotti,S., Zunino,F., and Daidone,M.G. (2002). Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cell Mol. Life Sci.* 59, 1406-1412.
- Zaffaroni,N., Pennati,M., and Daidone,M.G. (2005). Survivin as a target for new anticancer interventions. *J. Cell Mol. Med.* 9, 360-372.
- Zhang,J., Jia,Z., Li,Q., Wang,L., Rashid,A., Zhu,Z., Evans,D.B., Vauthey,J.N., Xie,K., and Yao,J.C. (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, 1478-1486.
- Zhang,M., Latham,D.E., Delaney,M.A., and Chakravarti,A. (2005). Survivin mediates resistance to antiandrogen therapy in prostate cancer. *Oncogene* 24, 2474-2482.

Zorov,D.B. (1996). Mitochondrial damage as a source of diseases and aging: a strategy of how to fight these. *Biochim. Biophys. Acta.* 1275, 10-15.

Verzeichnis der dieser Arbeit zugrunde liegenden Publikationen

Originalarbeiten:

S. Lorenzen, T. Schuster, R. Porschen, S.E. Al-Batran, R. Hofheinz, P Thuss-Patience, M. Moehler, **P. Grabowski**, D. Arnold, T. Greten, L. Müller, N. Röthling, C. Peschel, R. Langer, F. Lordick (2009)

„Cetuximab plus cisplatin-5-fluorouracil versus cisplatin-5-fluorouracil alone in first-line metastatic squamous cell carcinoma of the esophagus: a randomized phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie“

Annals of Oncology, 10:1667-73

I. Georgieva, D. Koychev, Y. Wang, J. Holstein, W. Hopfenmüller, M. Zeitz, **P. Grabowski** (2009)

“ZM 447439, a novel promising aurora kinase inhibitor, provokes antiproliferative and pro-apoptotic effects alone and in combination with bio- and chemotherapeutic agents in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor cell lines”

Neuroendocrinology, Nov 14. [Epub ahead of print]

C.N. Arnold, T. Nagasaka, A. Goel, I. Scharf, **P. Grabowski**, A. Sosnowski, A. Schmitt-Gräf, C.R. Boland, R. Arnold, H.E. Blum (2008)

„Molecular characteristics and predictors of survival in patients with malignant neuroendocrine tumors“

International Journal of Cancer 123(7):1556-64

P. Grabowski, J. Schrader, J. Wagner, D. Hörsch, R. Arnold, C.N. Arnold, I. Georgieva, H. Stein, M. Zeitz, P.T. Daniel, I. Sturm (2008)

“Loss of nuclear p27 expression and its prognostic role in relation to cyclin E and p53 mutation in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors”

Clinical Cancer Research, 14: 7378-7384

P. Grabowski, I. Sturm, K. Schelwies, K. Maaser, H.-J. Buhr, M. Zeitz, B. Dörken, P.T. Daniel, H. Scherübl (2006)

“Analysis of neuroendocrine differentiation and the p53/BAX pathway in UICC stage III colorectal carcinoma identifies patients with good prognosis”

International Journal of Colorectal Disease 21: 221-230

P. Grabowski*, K. Maaser*, C. Hanski, H. Stein, I. Sturm, W. Hopfenmüller, B. Dörken, H.J. Buhr, M. Zeitz, H. Scherübl (2005)

„Prognostic value of multimarker analysis in stage III colorectal cancer: one step forward towards an individualized therapy decision”

Onkologie 28: 399-403

P. Grabowski, S. Griß, C.N. Arnold, D. Hörsch, R. Göke, R. Arnold, B. Heine, H. Stein, M. Zeitz, H. Scherübl (2005)

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

Neuroendocrinology 81:1-9

K. Maaser*, **P. Grabowski***, Y. Özdem, A. Krahn, B. Heine, H.-J. Buhr, M. Zeitz, H. Stein, H. Scherübl (2005)

“Up-regulation of the peripheral benzodiazepine receptor during human colorectal carcinogenesis and tumor spread”

Clinical Cancer Research 11:1751-1756

A.P. Sutter, K. Maaser, **P. Grabowski**, G. Bradacs, K. Vormbrock, M. Höpfner, A. Krahn, B. Heine, H. Stein, R. Somasundaram, D. Schuppan, M. Zeitz, H. Scherübl (2004)

“Peripheral benzodiazepine receptor ligands induce apoptosis and cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma cells and enhance chemosensitivity to paclitaxel, docetaxel, doxorubicin and the Bcl-2 inhibitor HA 14-1”

Journal of Hepatology 41: 799-807

K. Maaser, A.P. Sutter, A. Krahn, M. Höpfner, **P. Grabowski**, H. Scherübl (2004)

“Cell cycle-related signaling pathways modulated by peripheral benzodiazepine receptor ligands in colorectal cancer cells”

Biochemical and Biophysical Research Communications 324: 878-886

P. Grabowski, T. Kühnel, F. Mühr-Wilkenshoff, B. Heine, H. Stein, M. Höpfner, C.T. Germer, M. Zeitz, H. Scherübl (2003)

“Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma”

British Journal of Cancer 88(1): 115-119

K. Schelwies, I. Sturm, **P. Grabowski**, H. Scherübl, I. Schindler, S. Hermann, H. Stein, H.J. Buhr, E.O. Riecken, M. Zeitz, B. Dörken, P.T. Daniel (2002)

“Low bax protein expression is a negative prognostic factor in primary colorectal cancer”

International Journal of Cancer 99: 589-596

P. Grabowski, J. Schönfelder, G. Ahnert-Hilger, H.D. Foss, B. Heine, I. Schindler, H. Stein, G. Berger, M. Zeitz, H. Scherübl (2002)

“Expression of neuroendocrine markers: A signature of human undifferentiated carcinoma of the colon and rectum“

Virchows Archiv 441(3): 256-263

A.P. Sutter, K. Maaser, M. Höpfner, B. Barthel, **P. Grabowski**, S. Faiss, P. Carayon, M. Zeitz, H. Scherübl (2002)

“Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human oesophageal cancer cells“

International Journal of Cancer 102(4): 318-327

K. Maaser*, **P. Grabowski***, I. Schindler, H.D. Foss, H. Stein, P. Carayon, M. Gavish, E.O. Riecken, M. Zeitz, H. Scherübl (2002)

“Overexpression of the peripheral-type benzodiazepine receptor is a relevant prognostic factor in stage III colorectal cancer”

Clinical Cancer Research 8 (10): 3205-3209

K. Lemmer, G. Ahnert-Hilger, M. Höpfner, S. Hoegerle, S. Faiss, **P. Grabowski**, M. Jockers-Scherübl, E.O. Riecken, M. Zeitz, H. Scherübl (2002)

“Expression of dopamine receptors and transporter in neuroendocrine gastrointestinal tumor cells”

Life Sciences 72: 667-678

P. Grabowski, I. Schindler, I. Anagnostopoulos, H.D. Foss, E.O. Riecken, U. Mansmann, H. Stein, G. Berger, H.J. Buhr, H. Scherübl (2001)

“Neuroendocrine differentiation is a relevant prognostic factor in stage III-IV colorectal cancer“

European Journal of Gastroenterology and Hepatology 13: 405-411

P. Grabowski, B. Mann, U. Mansmann, N. Lövin, H.D. Foss, G. Berger, H. Scherübl, E.O. Riecken, H.J. Buhr, C. Hanski (2000)

“Expression of sialyl-Lex antigen defined by MAb AM-3 is an independent prognostic marker in colorectal carcinoma patients“

International Journal of Cancer 88: 281-286

Buchbeiträge:

P. Grabowski, A.P. Sutter, H. Scherübl (2006)

„Molekulare Regulation neuroendokriner Tumoren des Gastrointestinaltraktes.“

In: Ganten D (Hrsg.), Molekularmedizinische Grundlagen von Endokrinopathien 2 – Para- und autokrine Regulation. Springer Verlag, Heidelberg.

* both authors contributed equally (Fußnote der Publikation)

6 Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik I, Gastroenterologie/Infektiologie/Rheumatologie der Charité–Universitätsmedizin in Berlin, Campus Benjamin Franklin von 1998–2007 durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Riecken als mein „erster Chef“ und Herrn Prof. Dr. Zeitz in der Folge danke ich in besonderer Weise und sehr herzlich für die immerwährende freundliche Unterstützung und ihr stetiges Interesse an meiner Arbeit – in guten wie in schwierigen Zeiten. Ihnen ist es zu verdanken, dass mit viel Ehrgeiz diese Arbeit zu einem guten Ende gefunden hat. Beide Abteilungsleiter haben aber auch meine klinische Ausbildung von Anbeginn geprägt und mir die Freiheit gelassen, sowohl wissenschaftlich als auch klinisch meinen Interessenschwerpunkten nachzugehen. Dafür danke ich Ihnen beiden sehr herzlich.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Scherübl. Er hat mein Interesse am Thema geweckt, mich kritisch hinterfragt, in langen fruchtbaren Diskussionen viele, viele Anregungen gegeben und finanziell und inhaltlich die Arbeit über lange Jahre betreut. Er hat mir alle Möglichkeiten an die Hand gegeben, diese Arbeit eigenständig durchzuführen und mich in jeder Hinsicht unterstützt.

Eine gute Arbeit kann nur in einem guten Umfeld gelingen. Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sowie unseren Labornachbarinnen der Kardiologie möchte ich ein herzliches Dankeschön für das gute Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft im Laboralltag aussprechen. Insbesondere bedanke ich mich bei Frau PD Dr. Kerstin Maaser für ihre biochemisches Grundlagenwissen und jede Menge „Gehirnjogging“, das zu vielen guten Ideen und Umsetzung in wissenschaftliche Fragestellungen geführt hat. Herr PD Dr. Michael Höpfner hat meine ersten Zellkultur-Schritte begleitet, viele produktive Diskussionen geliefert, aber auch Ideen zur Antragstellung und Drittmittelakquise gefunden. Dafür danke ich ihm sehr. Herrn Dr. Andreas Sutter danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit, die anregenden Diskussionen und die vielfältige Unterstützung. Bei dem Schritt zu eigenen Projekten hat mich in der Anfangsphase Frau Dr. Viola Baradari unterstützt, herzlichen Dank auch hierfür.

Mein besonderer Dank gilt aber Herrn Prof. Dr. Hanski und Frau Marie-Louise Hanski, die mir über all die Jahre soviel Hilfestellung und Unterstützung gegeben haben.

Für die hervorragende technische Unterstützung möchte ich Frau Bettina Ergün und Frau Antje Krahn sowie den technischen Assistentinnen des Instituts für Pathologie recht herzlich danken, namentlich Conny Cieluch und Erika Berg.

In dieser Zeit sind einige Doktorarbeiten entstanden, hier möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit mit Frau Dr. Isabell Schindler, Frau Dr. Julia Schönfelder, Herrn Tobias Kühnel, Frau Yelda Özdem, Frau Sonja Griss und Frau Yawen Wang bedanken. Mein besonderer Dank gilt aber Frau Dr. Inna Georgieva, die unglaublich viel Arbeit und Zeit im Labor bei der Umsetzung meiner Ideen verbracht hat.

Ohne Kooperationen hätte diese Arbeit niemals in dieser Bandbreite Ergebnisse finden können. Im Haus danke ich allen voran den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Pathologie, namentlich Herrn Prof. Dr. Anagnostopoulos, Herrn Prof. Dr. Foss, Herrn Dr. Bernhard Heine, Herrn Prof. Dr. Loddenkemper und - über allem - Herrn Prof. Stein für seine fortdauernde freundliche Unterstützung meiner Arbeit. Im Institut für Statistik hat Herr PD Dr. Werner Hopfenmüller manches graue Haar bekommen, während er viel Zeit mit mir über der Lösung statistischer Probleme verbrachte.

Am Campus Virchow bzw. Campus Buch habe ich über lange Jahre fruchtbare Diskussionen und hervorragende Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Isrid Sturm erleben dürfen, der ich sehr herzlich für ihre umfassende Hilfe in allen Lebenslagen danke. Herr Prof. Dr. Daniel hat die Arbeit kritisch überwacht und mir die Möglichkeit gegeben, in seinem Labor neue Methoden erlernen zu dürfen, herzlichen Dank dafür. Herrn Prof. Dr. Wiedenmann gilt mein besonderer Dank für die grundlegende Liebe zu den neuroendokrinen Tumoren, die mir mit Beginn des AiP eingepflegt wurde und seinen Mitarbeitern, namentlich Frau Dr. Katharina Detjen und Herrn Dr. Arne Scholz für viele fruchtbare Diskussionen und gute Zusammenarbeit.

Die Patientenkollektive wären nicht vollständig, wenn ich nicht die wunderbare Kooperation mit Herrn PD Dr. Christian Arnold (ehemals Freiburg) und meinem jetzigen Chef, Herrn PD Dr. Dieter Hörsch (ehemals Marburg, jetzt Bad Berka) hätte erfahren dürfen. Letztgenanntem danke ich neben der Möglichkeit, diese Arbeiten zu teilen, für seine fortwährende unglaubliche Unterstützung und Förderung bis zum heutigen Tag.

Für die Forschungsförderung möchte ich mich herzlich bei der Kommission für Nachwuchswissenschaftlerinnen und hier natürlich insbesondere bei meiner Mentorin, Frau Prof. Dr. Martiny bedanken, die mich mental und inhaltlich tatkräftig unterstützt hat und über all die Zeit immer an mich geglaubt hat. Weiterhin bei der Sonnenfeld-Stiftung und der Berliner Krebsgesellschaft für ihre vielfältige Labor- und Reiseunterstützung.

Last but not least ist es die Familie, die einen trägt. Hier möchte ich meinen Eltern für ihre immer währende Präsenz in allen Lebenslagen danken, die mir mein Medizinstudium und alle weitere Karriere ermöglicht haben. Meinen Kindern danke ich für all die Liebe, die ich

von ihnen erfahren darf und Herrn Michael Bethke für sein ständig offenes Ohr, all die kleinen und großen Hilfen und seine Geduld mit mir in einer besonderen, sicher nicht ganz einfachen Zeit.

7 Eidesstattliche Erklärung

gemäß der Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern / Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 18.12.2009

Dr. med. Patricia Grabowski