

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel

Die Rolle von Survivin und XIAP als Zielstrukturen einer zielgerichteten
Tumorthherapie im Ösophaguskarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Lisa-Marie Jünemann

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Andreas Krieg

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Dirk Graf

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Dizdar, L. et al. *Clinicopathological and functional implications of the inhibitor of apoptosis proteins survivin and XIAP in esophageal cancer*. ONCOLOGY LETTERS 15: 3779-3789, 2018

I. Zusammenfassung

Das Ösophaguskarzinom ist in Deutschland eine verbreitete Tumorentität und hat trotz extensiver Therapieansätze weiterhin eine schlechte Prognose. Als Mitglieder der Inhibitor of Apoptosis Protein Familie (IAP) eignen sich Survivin und X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) als Ansatzpunkte für eine alternative Therapie, da sie bekannter Weise in vielen malignen Tumoren überexprimiert und mit einer schlechten Prognose assoziiert sind. In dieser Arbeit wurde die prognostische und biologische Relevanz von Survivin und XIAP in den zwei Subtypen des Ösophaguskarzinoms, dem Plattenepithelkarzinom (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) und dem Adenokarzinom (esophageal adenocarcinoma, EAC) untersucht.

Zunächst wurden 120 Proben von ESCC- und 90 von EAC-Patienten in Form von Tissue Microarrays (TMA) mittels Immunhistochemie ausgewertet. Die Survivin- und XIAP-Expression wurde mit klinisch-pathologischen Parametern und Überlebensdaten korreliert. Weiterhin wurde die Survivin- und XIAP-Expression an vier ESCC-Zelllinien und zwei EAC-Zelllinien untersucht und der Einfluss von spezifischen Survivin- (YM155, M4N) und XIAP-Inhibitoren (AT406, GDC-0152, Birinapant) *in vitro* getestet.

Es zeigte sich in beiden histologischen Subtypen eine erhöhte Survivin- und XIAP-Expression im Vergleich zur Normalmukosa. Die Korrelation mit klinisch-pathologischen Parametern ergab im ESCC einen Zusammenhang zwischen XIAP-Expression und weiblichem Geschlecht, sowie fortgeschrittenem Tumorstadium. Weiterhin bestand ein Zusammenhang zwischen Survivin-Expression und schlechter Tumordifferenzierung. In der Überlebensanalyse stellten sich im EAC die Metastasierung und im ESCC die XIAP-Expression als unabhängige negativ prognostische Faktoren dar. YM155 zeigte eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität, Abnahme der Survivin-Expression und Induktion einer PARP-Spaltung auf Proteinebene. Für die XIAP-Compounds Birinapant und GDC konnte kein zytotoxischer Effekt auf die verwendeten Zelllinien nachgewiesen werden.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Survivin und XIAP in der molekularen Pathogenese des Ösophaguskarzinoms eine wichtige Rolle spielen und Survivin ein Angriffspunkt für eine zielgerichtete Therapie sein könnte.

Abstract: The Impact of Survivin and XIAP in targeted therapy of esophageal cancer

Esophageal Carcinoma is a common cancer entity in Germany. Despite extensive and various therapy approaches the prognosis still remains poor. As members of the family of inhibitors of Apoptosis Protein (IAP) Survivin and X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) are suitable targets for an alternative therapy, as they are known to be overexpressed in a variety of malignant tumors and associated with poor outcome. The prognostic and biological relevance of Survivin and XIAP in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and esophageal adenocarcinoma (EAC) were investigated in this thesis.

120 ESCC-samples and 90 EAC-samples were examined via immunohistochemistry using Tissue Microarrays (TMA). The correlation between Survivin/XIAP and clinicopathological parameters as well as survival data was investigated. Furthermore, Survivin and XIAP expression was assessed in four ESCC-cell lines and in two EAC-cell lines testing the in-vitro-effect of specific Survivin (YM155, M4N) and XIAP inhibitors (AT406, GDC-0152, Birinapant).

We could demonstrate that in both histological subtypes Survivin and XIAP were overexpressed when compared to normal tissue. The correlation with clinicopathological parameters in ESCC revealed an association between XIAP-expression and female gender, as well as advanced tumor stage. Moreover, a correlation between Survivin expression and poor tumor grading could be shown. Survival analysis revealed metastatic spread in EAC and XIAP-Expression in ESCC to be independent negative predictors. YM155 induced a dose related reduction of cell viability, a decrease of Survivin expression and induction of PARP-cleavage on protein level. A cytotoxic effect on the analyzed cell lines could not be shown for XIAP-compounds Birinapant and GDC.

Our results confirm that Survivin and XIAP play an important role in the molecular pathogenesis of esophageal carcinoma and suggest Survivin to be a special target in targeted therapy.

II. Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptosis Inducing Factor	ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbend Assay
AIP	Aryl Hydrocarbon Receptor – Interacting Protein	ESCC	Esophageal Squamous Cell Carcinoma
AJCC	American Joint Committee on Cancer	EUS	Endoskopischer Ultraschall
Apaf	Apoptotic Protease Activating Factor	GORD	Gastro-esophageal Reflux Disease
BAX	Bcl-2 associated X Protein	HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
Bcl	B-Cell-Lymphoma-Protein	HR	Hazard Ratio
BID	BH3 interacting-domain death -Agonist	HRP	Horseradish-Peroxidase
BIR	Bacloviral IAP Repeat	Hsp	Heat-Shock Protein
BIRC	Bacloviral IAP repeat containing	IAP	Inhibitor of apoptosis protein
BrdU	5-Brom-2-Desoxyuridin	IBM	IAP binding motif
BSA	Bovine Serum Albumin	IHC	Immunhistochemie
CARD	Caspase Recruitment Domain	ILP	IAP-like Protein
cIAP	cellular IAP	INCEP	Inner Centromer Protein
CPC	Chromosomal Passenger Complex	IRS	Immunreaktiver Score
CT	Computertomographie	IκBK	Inhibiting κB – Kinase
DIABLO	Direct IAP-binding protein with low pI	LRR	Leucine-Rich Repeat
DMSO	Dimethylsulfoxid	M4N	Tetra-O-methyl Nordihydroguaiaretic Acid
EAC	Esophageal Adenocarcinoma	ML-IAP	Melanoma IAP
ECL	enhanced chemiluminescence	NAIP	Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein
		NFκB	Nuclear Factor κB

NLR	NOD-like Receptor	UBC	ubiquitin-conjugating
NSAID	Nonsteroidal anti-inflammatory Drugs	UICC	Union internationale contre le cancer
ÖGD	Ösophago-Gastro-Duodenoskopie	VEGF	Vascular Epidermal Growth Factor
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase	XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis
PBS	Phosphate-Buffered Saline		
PET	Positronen-Emissions-Tomographie		
RING	really interesting new gene		
rpm	rounds per minute		
SCC	Squamous Cell Carcinoma		
SDS	sodium dodecyl sulfate		
Smac	second mitochondrial-derived activator of caspases		
TAB1	Tak1-binding Protein		
TAK1	TGF β -activating Kinase		
TBST	Tri-Buffered Saline and Tween20		
TGFβ	Transforming Growth Factor β		
TMA	Tissue Microarrays		
TMB	Tetramethylbenzidin		
TNF	Tumor necrosis factor		
TNFR	Tumor necrosis factor receptor		
TNM	Pathologic Tumor, Node, Metastasis -System		
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inhibiting Ligand		
UBA	ubiquitin-associated		

III. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Ösophaguskarzinom.....	1
1.1.1 Epidemiologie des Ösophaguskarzinoms.....	1
1.1.2 Pathogenese und Risikofaktoren	1
1.1.3 Diagnostik und Staging	3
1.1.4 Der multimodale Therapieansatz.....	5
1.1.5 Zukunftsaussichten.....	6
1.2 Die regulierte Form des natürlichen Zelltodes: Apoptose.....	8
1.3 Die IAP- Familie: Target-Struktur in der Krebsforschung.....	10
1.3.1 Struktur und Funktion der IAPs	10
1.3.2 Survivin – mehr als ein Apoptose-Inhibitor	12
1.3.3 XIAP: ein direkter Caspase-Inhibitor.....	13
1.3.4 Survivin und XIAP in Tumoren	15
1.3.5 Stand der Forschung: Survivin und XIAP im Ösophaguskarzinom.....	16
2. Ziele der Arbeit	18
3. Material und Methoden	19
3.1 Material	19
3.1.1 Laborgeräte.....	19
3.1.2 Plastikwaren und Einwegartikel	19
3.1.3 Chemikalien.....	20
3.1.4 Molekularbiologische Kits	21
3.1.5 Puffer und Lösungen	21
3.1.6 Antikörper	23
3.1.7 Zellkulturmedien	23
3.1.8 Zelllinien	23
3.1.9 Patientenselektion und klinisch-pathologische Daten	24
3.1.10 Software.....	24

3.2 Methoden.....	25
3.2.1 Kultivierung von adhärenen Zellen.....	25
3.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl.....	25
3.2.3 CellTiter 96® AQ _{ueous} One Solution Cell Proliferation Assay.....	25
3.2.4 Zellproliferations-ELISA.....	26
3.2.5 Proteinchemische Methoden.....	28
3.2.6 HRP-Immunhistochemie.....	30
3.2.7 Statistische Datenanalyse.....	32
4. Ergebnisse.....	34
4.1 Patientcharakteristika.....	34
4.2 Co-Expression von Survivin und XIAP im Ösophaguskarzinom.....	35
4.2.1 Expressionsanalyse in Tumor- und Normalgewebe.....	35
4.2.2 Korrelation zwischen Survivin-/XIAP-Expression und klinisch pathologischen Parametern.....	37
4.2.3 Prädiktive Faktoren in der Überlebensanalyse.....	40
4.2 Survivin und XIAP als Zielstruktur von Inhibitoren.....	42
4.2.1 Grundexpression der IAPs in Ösophaguskarzinom-Zelllinien.....	42
4.2.2 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Lebendzellzahl.....	42
4.2.3 Der Einfluss von YM155 in Ösophagus-Zelllinien.....	47
5. Diskussion.....	49
5.1 Die IAP-Familie im Ösophaguskarzinom.....	49
5.1.1 Survivin als prognostischer Faktor.....	49
5.1.2 Unterschätzter Marker im Ösophaguskarzinom – XIAP.....	51
5.2 Die IAP-Familie in der zielgerichteten Therapie.....	52
5.2.1 XIAP: BIR-Domänen im Fokus von Inhibitoren.....	52
5.2.2 Survivin als vielversprechende Zielstruktur.....	53
5.2.3 YM155: Ein Survivininhibitor?.....	54
6. Schlussfolgerung.....	57

IV. Literaturverzeichnis	58
V. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	64

1. Einleitung

1.1 Das Ösophaguskarzinom

Weltweit ist das Ösophaguskarzinom das neunthäufigste Karzinom und liegt auf der Liste der krebsassoziierten Todesfälle auf Platz sechs [1]. Insgesamt wurden im Jahr 2013 442 000 Neuerkrankungen und 440 000 Todesfälle gezählt [1]. Bei steigender Inzidenz liegt die Fünf-Jahres-Überlebensrate zwischen 15% und 25% [2]. Trotz der bekannten Zusammenhänge mit bestimmten Risikofaktoren wird das Ösophaguskarzinom oft erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert [3]. Diese späten Diagnosestellungen bedingen eine schlechtere Prognose, wohingegen bei Diagnosen im frühen Stadium höhere Überlebensraten verzeichnet werden können [4]. Im Frühstadium (T1) wird in Deutschland zur Zeit allerdings nur jede achte Erkrankung diagnostiziert [5]. Die Herausforderungen der Therapie sind dementsprechend enorm und erfordern multidisziplinäre Teams und Behandlungsansätze [6, 7].

1.1.1 Epidemiologie des Ösophaguskarzinoms

Es werden mehrere histologische Subtypen des Ösophaguskarzinoms unterschieden, wobei das Plattenepithelkarzinom, *esophageal squamous cell carcinoma* (ESCC), die weltweit meist verbreitete Form ist [3]. Man verzeichnet jedoch eine steigende Inzidenz an Adenokarzinomen des Ösophagus, *esophageal adenocarcinoma* (EAC) [8], wobei deren Anteil in den USA bereits über dem der Plattenepithelkarzinome liegt [9]. In Deutschland verzeichnet man bei einem Anteil von 50% bis 60% an Plattenepithelkarzinomen einen Anstieg der EAC auf ein Drittel aller Ösophaguskarzinome in 2010 [5]. Global betrachtet sind die EAC am meisten verbreitet in Ländern mit europäisch stämmiger Bevölkerung, vor allem Nord- und Westeuropa, sowie Nordamerika [10]. Unabhängig von der histologischen Typisierung haben Männer eine höhere Wahrscheinlichkeit zu erkranken als Frauen, betrachtet in einer Altersspanne bis zu 79 Jahren [1]. In Deutschland liegt die Wahrscheinlichkeit zu erkranken bei 4:1 zu Lasten der männlichen Patienten [5]. Es zeichnet sich somit ein vermehrtes Vorkommen von EAC in einkommensstarken Ländern ab, wobei Männer ein höheres Erkrankungsrisiko aufweisen als Frauen [10].

1.1.2 Pathogenese und Risikofaktoren

Es wurden mehrere Risikofaktoren identifiziert, die zur Entstehung eines Ösophaguskarzinoms beitragen, wobei nach Plattenepithel- und Adenokarzinomen unterschieden werden kann (Tabelle 1). Tabakkonsum gilt als wichtiger Risikofaktor beider

histologischer Typen, wobei sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen Dosis und Dauer des Tabakkonsums zeigt [11]. Auch die Achalasie als funktionelle Störung des unteren Ösophagussphinkters führt zu einem erhöhten Risiko für ESCC und EAC [12].

Als grundlegender pathologischer Einfluss wird bei den EACs die gastroösophageale Refluxkrankheit (GORD) angesehen [13]. Es besteht eine positive Korrelation zwischen Auftreten einer symptomatischen GORD und dem Risiko der Entstehung eines EAC; Patienten mit starker Symptomatik haben ein zwanzigfach erhöhtes Risiko gegenüber asymptomatischen Patienten [14]. Ebenfalls als Risikofaktor für das EAC wird das durch die GORD verursachte Barrett-Syndrom aufgeführt, welches als metaplastische Umwandlung des ösophagealen Plattenepithels in Zylinderepithel mit Becherzellen definiert ist [15]. Der Barrett-Ösophagus gilt als Vorstufe des EAC, jedoch entwickeln nur 10% der betroffenen Patienten in Langzeitstudien eine hochgradige Dysplasie oder ein Karzinom [16]. Weiterhin ist ein Zusammenhang zwischen Adipositas und dem Auftreten eines EAC belegt [17]. Ein simultanes Auftreten von GORD und Adipositas erhöht dabei zusätzlich das Risiko [2, 3]. Unabhängig von der GORD sind steigendes Alter und das männliche Geschlecht in Studien als größte Risikofaktoren beschrieben worden [3]. Die Ätiologie der Unterschiede zwischen den Geschlechtern muss dabei als multifaktoriell angesehen werden, da die unterschiedliche Ausprägung bestimmter Risikofaktoren das Risiko unter Männern erhöht [3].

Bei den Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus gilt der Alkoholabusus als größter Risikofaktor [11]. Die Kombination mit Tabakkonsum erhöht das Risiko dabei zusätzlich [18]. Weiterhin besteht ein positiver Zusammenhang zwischen dem Auftreten eines ESCC und erhöhtem Risiko an Kopf-/Halstumoren zu erkranken und umgekehrt [13]. Als weitere Risikofaktoren werden niedriger sozioökonomischer Status, schlechte Mundhygiene und Nährstoffmangel aufgeführt [2].

Tabelle 1: Risikofaktoren für die Entstehung eines Ösophaguskarzinoms.

Ösophageales Plattenepithelkarzinom	Ösophageales Adenokarzinom
Rauchen	GORD
Alkohol	Barrett's-Ösophagus
Achalasie	Adipositas
Strahlentherapie	Rauchen
Niedriger sozioökonomischer Status	Erhöhtes Alter
Schlechte Mundhygiene	Männliches Geschlecht
Nährstoffmangel	

Klinisch stellen sich Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus mit länger bestehender Dysphagie und Gewichtsverlust vor, oft kann Tabak- und Alkoholabusus in der Anamnese erhoben werden [2]. Patienten mit Adenokarzinomen des Ösophagus klagen dagegen über schnell zunehmende Dysphagie in den vergangenen Monaten und bestehenden gastro-

ösophagealen Reflux [2]. Fatigue ist ein weiteres häufiges Symptom, selten kann eine Eisenmangel-Anämie festgestellt werden [3]. Bei Diagnosestellung kann nur bei 25% der Patienten mit EAC eine Erkrankung im Frühstadium diagnostiziert werden [2]. Dafür wird bei einer steigenden Anzahl von asymptomatischen Patienten ein Karzinom während einer Vorsorge-Endoskopie entdeckt [19].

1.1.3 Diagnostik und Staging

Zur Diagnosestellung wird eine frühzeitige Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD) mittels hochauflösender Videoendoskopie als Standardverfahren empfohlen [13]. Dabei sollten Biopsien aus allen suspekten Läsionen entnommen und histopathologisch untersucht werden [6, 13].

Die Histologie der Ösophagus-Wand entspricht der des Verdauungstrakts und enthält die Schichten Mukosa, Submukosa, Muskularis Propria und Adventitia [20]. Die Mukosa besteht aus einer Epithelschicht, der Lamina propria und Muskularis Mucosae und ist durch die Basalmembran von der Submukosa abgegrenzt; sobald die Basalmembran durchbrochen wird, spricht man von einem invasiven Karzinom [3, 20]. Die internationale TNM-Klassifikation orientiert sich an diesen anatomischen Schichten (s. Tabelle 2) [21]. Sie ordnet das Ausmaß des Tumors aufgrund von Lokalisation, Histologie und klinischem Ausbreitungsbild prognostisch ein (s. Tabelle 3) [22]. Da die Prognose stark mit lokaler Tumorerkrankung und dem Grad der Aussaat ins lymphatische Gewebe zusammenhängt, ist ein möglichst genaues Staging nötig, um die bestmögliche individuelle Therapieentscheidung zu treffen [13]. Allgemein unterscheidet man drei Ausprägungsgrade der Tumorerkrankungen: das lokal begrenzte Stadium (Tis-T2, N0-1), das lokal fortgeschrittene Stadium (T3-4, N0-1) und das fernmetastasierte Stadium (M1) [7].

Nach Histologischer Sicherung folgt das Staging mit Hilfe von CT-Untersuchungen des Thorax und des Abdomens, sowie der Endosonographie (EUS) [7]. Die Endosonographie ist bei der Festlegung des T-Stadiums und der Identifikation regionärer Lymphknoten dem CT bzw. PET-CT überlegen [23, 24]. Daher sollte die Indikationsstellung zur Endosonographie großzügig erfolgen, sodass Patienten für die verschiedenen Therapieansätze selektiert werden können [13]. PET-CT und CT können zum Nachweis von Fernmetastasen kombiniert werden, um eine vollständige Abklärung des Ösophagus zu gewährleisten [23].

Tabelle 2: TNM-Klassifikation der Ösophaguskarzinome und der Karzinome des gastro-ösophagealen Übergangs. (Adaption aus TNM-Manual [21])

Tis	Carcinoma in situ/ High-grade Dysplasie
T1	Lamina propria oder Submukosa
T1a	Lamina propria oder Muscularis Mucosae
T1b	Submukosa
T2	Muscularis propria
T3	Adventitia
T4	Angrenzende Strukturen
T4a	Pleura, Perikard, Diaphragma, angrenzendes Peritoneum
T4b	Andere angrenzende Strukturen (z.B. Aorta, Wirbelkörper, Trachea)
N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	1-2 regionale Lymphknotenmetastasen
N2	3-6
N3	>7
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 3: AJCC/UICC- Stadieneinteilung des Ösophaguskarzinoms. (prognostische Gruppeneinteilung, Adaption aus TNM-Manual [21, 25]). Unterteilt nach Adenokarzinom (EAC) und Plattenepithelkarzinom (ESCC) des Ösophagus

Stage	EAC				ESCC				
	T	N	M	Grad	T	N	M	Grad	Lokalisation
0	is	0	0	1	is	0	0	1	Jede
IA	1	0	0	1-2	1	0	0	1	Jede
IB	1	0	0	3	1	0	0	2-3	Jede
	2	0	0	1-2	2-3	0	0	1	Intrathorakal unten
IIA	2	0	0	3	2-3	0	0	1	Intrathorakal oben, mittig
					2-3	0	0	2-3	Intrathorakal unten
IIB	3	0	0	Jeder	2-3	0	0	2-3	Intrathorakal oben, mittig
	1-2	1	0	Jeder	1-2	1	0	Jeder	Jede
IIIA	1-2	2	0	Jeder	1-2	2	0	Jeder	Jede
	3	1	0	Jeder	3	1	0	Jeder	Jede
	4a	0	0	Jeder	4a	0	0	Jeder	Jede
IIIB	3	2	0	Jeder	3	2	0	Jeder	Jede
IIIC	4a	1-2	0	Jeder	4a	1-2	0	Jeder	Jede
	4b	Jedes N	0	Jeder	4b	Jedes N	0	Jeder	Jede
	Jedes T	N3	0	Jeder	Jedes T	N3	0	Jeder	Jede
IV	Jedes T	Jedes N	1	Jeder	Jedes T	Jedes N	1	Jeder	Jede

1.1.4 Der multimodale Therapieansatz

Die Therapieempfehlungen enthalten meist einen multimodalen Ansatz und sollten von einer interdisziplinären Tumorkonferenz ausgesprochen werden [13]. Diese sollten immer eine Riskioevaluation enthalten, die abhängig ist von tumor- (histologischer Typ, Lokalisation, TNM-Status) und patientenspezifischen (Alter, Komorbiditäten, Compliance, Performancestatus) Faktoren. Die Kombination und der Schweregrad der Begleiterkrankungen, die geplante Operationsdauer und eine eventuelle Vorbehandlung bestimmen dabei maßgeblich das Operationsrisiko [8].

Bei Frühkarzinomen des Ösophagus im lokal begrenzten Stadium ohne Hinweis auf lymphatische Aussaat mit einer Tumorgröße kleiner 2cm wird die endoskopische Resektion als wichtigstes therapeutisches Verfahren bewertet [7, 26]. Eine komplette Resektion mit kurativer Intention ist dabei anzustreben [13]. Die kalkulierten 5-Jahres-Überlebensraten liegen bei ca. 95% und sind vergleichbar mit denen nach kompletter chirurgischer Resektion [6, 27]. Exulzerierte Karzinome sind dagegen eher zu operieren [26].

Die Therapie der Wahl beim nicht-metastasierten operablen Primärtumor mit Ausnahme der Frühkarzinome stellt die komplette chirurgische Resektion (R0) dar [2]. Standard ist die thorakoabdominelle En-Bloc-Resektion des Ösophagus mit 2-Feld-Lymphadenektomie [8]. Die Gastrointestinale Passage wird dabei durch einen Magenhochzug wiederhergestellt [7]. Alternative Verfahren sind die Hybrid-Technik (Kombination aus transthorakalem Verfahren und Laparoskopie-Techniken) und das komplett minimal-invasive Verfahren [7]. Beide Techniken haben im Vergleich zu den offenen Verfahren eine geringere Morbiditätsrate bei einem onkologisch akzeptablen Ergebnis [28, 29]. Nach einer Ösophagektomie werden eine Krankenhausletalität von 5-10% und eine Komplikationsrate zwischen 30 bis 70% verzeichnet [8]. Um diese Werte zu senken, sollten operative Ösophagusresektionen an spezialisierten Kliniken mit hoher Fallzahl (>20 Ösophagektomien pro Jahr) und von erfahrenen Chirurgen durchgeführt werden [13]. Schließt die Risikoevaluation des Patienten trotz onkologischer Resektabilität eine Operation aus, besteht funktionelle Inoperabilität; andere Therapieverfahren sollten herangezogen werden [13].

Lokal fortgeschrittene Tumore (T3/T4) haben unabhängig von ihrem Lymphknotenbefall bei ausschließlich operativer Therapie eine schlechte Prognose [6]. Neoadjuvante Therapieverfahren konnten bei Patienten mit Tumoren in diesem Stadium die Überlebensrate um 10% in fünf Jahren verbessern [30]. Ziel ist dabei die Tumorregression auf weniger als 10% des Primärtumors, damit ein prognostischer Vorteil erreicht wird [30]. Es besteht eine signifikante Verlängerung des tumorfreien Überlebens bei der Kombination aus präoperativer Radiochemotherapie und Operation gegenüber der alleinigen Operation, sowie gleichzeitig höhere R0-Resektionsraten und geringere Neigung zu Lokalrezidiven [13, 31]. Bei

funktioneller Inoperabilität stellt die primäre Radiochemotherapie eine gleichwertige Therapieoption gegenüber der Operation dar, dabei wurden Überlebensraten von bis zu 20% verzeichnet [6, 7].

Bei einem Großteil der Patienten bestehen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon Fernmetastasen [7]. Eine symptomorientierte Therapie mit Fokus auf die Sicherung der enteralen Ernährung steht dabei im Vordergrund: Eine Bougierung der Tumorstenose kann dabei zu den Erstmaßnahmen gehören [32]. Dysphagiebeschwerden können durch Brachytherapie in wenigen Sitzungen reduziert werden, alternativ bringt die Einlage eines Ösophagus-Stents rasche Linderung [32, 33]. Darüber hinaus kann eine palliative Chemotherapie bei Patienten mit einem erwarteten Überlebenszeitraum von mehr als sechs Monaten in Betracht gezogen werden: bei Patienten mit EAC trägt sie zu einer Verbesserung des medianen Überlebens um drei bis vier Monate auf sieben bis zehn Monate bei [34]. Für Plattenepithelkarzinome des Ösophagus wurde kein signifikanter Überlebensvorteil nachgewiesen [6]. Vor Einleitung der Chemotherapie sollte der HER2-Status geprüft werden, um die Möglichkeit einer Therapie mit Trastuzumab zu evaluieren, welche einen nachgewiesenen Überlebensvorteil hat [13].

1.1.5 Zukunftsaussichten

In Studien zur Prävention des Ösophaguskarzinoms zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der Einnahme von Aspirin und NSAIDs und einem erniedrigten Risiko ein Adeno- oder Plattenepithelkarzinom der Speiseröhre zu entwickeln [35]. Andere Maßnahmen wie Lebensstilveränderungen, Diätmaßnahmen oder die Einstellung von Tabak- und Alkoholkonsum sind bisher nicht belegt [2].

Besonders Patienten, deren Diagnose erst im fortgeschrittenen Stadium gestellt wird, haben eine schlechte Prognose; daher sind bessere Screeningmethoden nötig um die Erkrankung im Frühstadium zu erkennen [3]. Zurzeit wird besonders das Screening bei der Tumorstufe Barrett-Ösophagus in Frage gestellt, da bis zu 40% der betroffenen Patienten keine Symptomatik aufweisen und so keiner Screening-Untersuchung zugeführt werden können [2]. Die Forschung auf dem Gebiet der minimal-invasiven Chirurgie, endoskopischer Behandlungsmethoden und zielgerichteter Therapie wird hoffentlich das Outcome verbessern [2].

Die schlechte Überlebensrate, auch unter multimodaler Therapie, zeigt, dass die Charakterisierung der zugrunde liegenden molekularen Veränderungen im ESCC und EAC unabdingbar ist [36]. Das zunehmende Verständnis der Karzinogenese des Ösophaguskarzinoms hat Angriffspunkte auf molekularer Ebene für neue Medikamente hervorgebracht. Diese sog. *Targeted Therapies* können zielgerichtet eingesetzt werden. Der

Wirkmechanismus gründet sich dabei auf die Beeinflussung von Schlüsselenzymen oder Signalwegen der Proliferation, Apoptose, Angiogenese und weiterer Mechanismen, die in der Tumorentstehung und Metastasierung eine Rolle spielen [36]. In klinischen Studien kommen beispielsweise der *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER2) und der *Vascular Epidermal Growth Factor* (VEGF) bereits in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika zur Anwendung in der Therapie des Ösophaguskarzinoms [37]. Die Forschung konzentriert sich zurzeit auf die molekularen Vorgänge, die spezifisch an der Entstehung und Therapieresistenz im ESCC und EAC beteiligt sind. Aus diesen Erkenntnissen könnten sich weitere Möglichkeiten einer zielgerichteten Therapie mit Verbesserung der Prognose des Ösophaguskarzinoms ergeben.

1.2 Die regulierte Form des natürlichen Zelltodes: Apoptose

Die Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose eine Form des Zelluntergangs, die einer strengen Regulation unterliegt. Sie kann durch externe Faktoren (*„Death Factors“*) oder interne Signale, wie DNA-Schäden oder oxidativen Stress, ausgelöst werden [38]. Caspasen sind ein zentrales Element des Apoptose-Signalweges. Man unterscheidet Initiator- und Effektorcaspasen, die hierarchisch angeordnet sind und im Signalweg sequentiell aktiviert werden [39]. Die Aktivierung der Effektorcaspase 3 stellt einen entscheidenden Schritt in der Initiierung der Apoptose dar und kann prinzipiell auf mehreren Wegen erfolgen (s. Abb. 1) [40].

Die Aktivierung des extrinsischen Signalweges erfolgt durch Bindung von Liganden an sogenannte Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche, beispielsweise an den TNF-Rezeptor oder TRAIL-Rezeptor [41]. Über Oligomerisierung der Rezeptoren entsteht ein Komplex, der über Todesdomänen (*Death Effector Domains*) die Initiator-Caspase 8 aktiviert, das Schlüsselenzym des extrinsischen Signalweges [42]. Der intrinsische Signalweg wird durch genotoxische oder metabolische Stimuli ausgelöst. Zellulärer Stress triggert dabei das Bcl2-Protein Bid, welches Bax aktiviert. Bax wiederum kann in seiner transformierten Form als Kanal in der äußeren Mitochondrienmembran fungieren und ermöglicht so die Freisetzung der Apoptosemediatoren Cytochrom C und Procaspase 9 [38]. Diese bilden zusammen mit Apaf-1 im Zytosol das Apoptosom, einen Komplex, der Caspase 9 aktiviert und somit zur Aktivierung von Effektorcaspasen führt [43]. Ebenfalls aus den Mitochondrien freigesetzt wird AIF (Apoptosis Inducing Factor), welcher Caspase-unabhängig den Zelltod auslösen kann [44]. Auch Smac/DIABLO stammt aus den Mitochondrien und führt im Zytosol zur Inhibition der IAPs, sodass die bereits initiierte Apoptose gefördert wird [45].

Die Apoptose spielt eine zentrale Rolle in der zellulären Homöostase und ist für die Kontrolle des Zellwachstums verantwortlich [46]. Eine außergewöhnlich hohe Zellproliferation oder Zellwachstum an ungewöhnlichen Orten induziert die Apoptose der betroffenen Zellen [47]. Eine Dysregulation dieser Vorgänge führt folglich zu einem Ungleichgewicht zwischen lebenden und sterbenden Zellen und kann so die Entstehung von Tumoren hervorrufen [48, 49]. Krebszellen haben Mechanismen entwickelt, um dem regulierten Zelltod zu entgehen, indem sie beispielsweise Caspasen in ihrer Aktivität inhibieren oder proapoptotische Komponenten der Zelle inaktiviert werden [47]. Auch die Dysregulation sogenannter Inhibitoren der apoptotischen Proteine (IAP) ist ein Mechanismus der Beeinflussung von Apoptose in Tumoren [50].

Die Behandlung von Krebspatienten beinhaltet meist Chemotherapie und Bestrahlung – zwei Ansätze, die ihre Wirkung über die Induktion von DNA-Schäden und folglich über Aktivierung der intrinsischen Apoptose erzielen [47]. Viele Tumore haben jedoch defekte apoptotische Signalwege und besitzen dadurch – im Gegensatz zur klassischen erworbenen

Resistenz nach Medikamentenexposition – eine grundsätzliche Resistenz gegen Chemotherapeutika bereits vor der ersten Gabe [38]. Da die Resistenz gegen Chemotherapeutika im klinischen Alltag ein großes Problem darstellt, scheint es umso wichtiger die Rolle der Apoptose im Zusammenhang mit verschiedenen Therapieansätzen und ihren Wirkungen auf Tumore zu untersuchen [38].

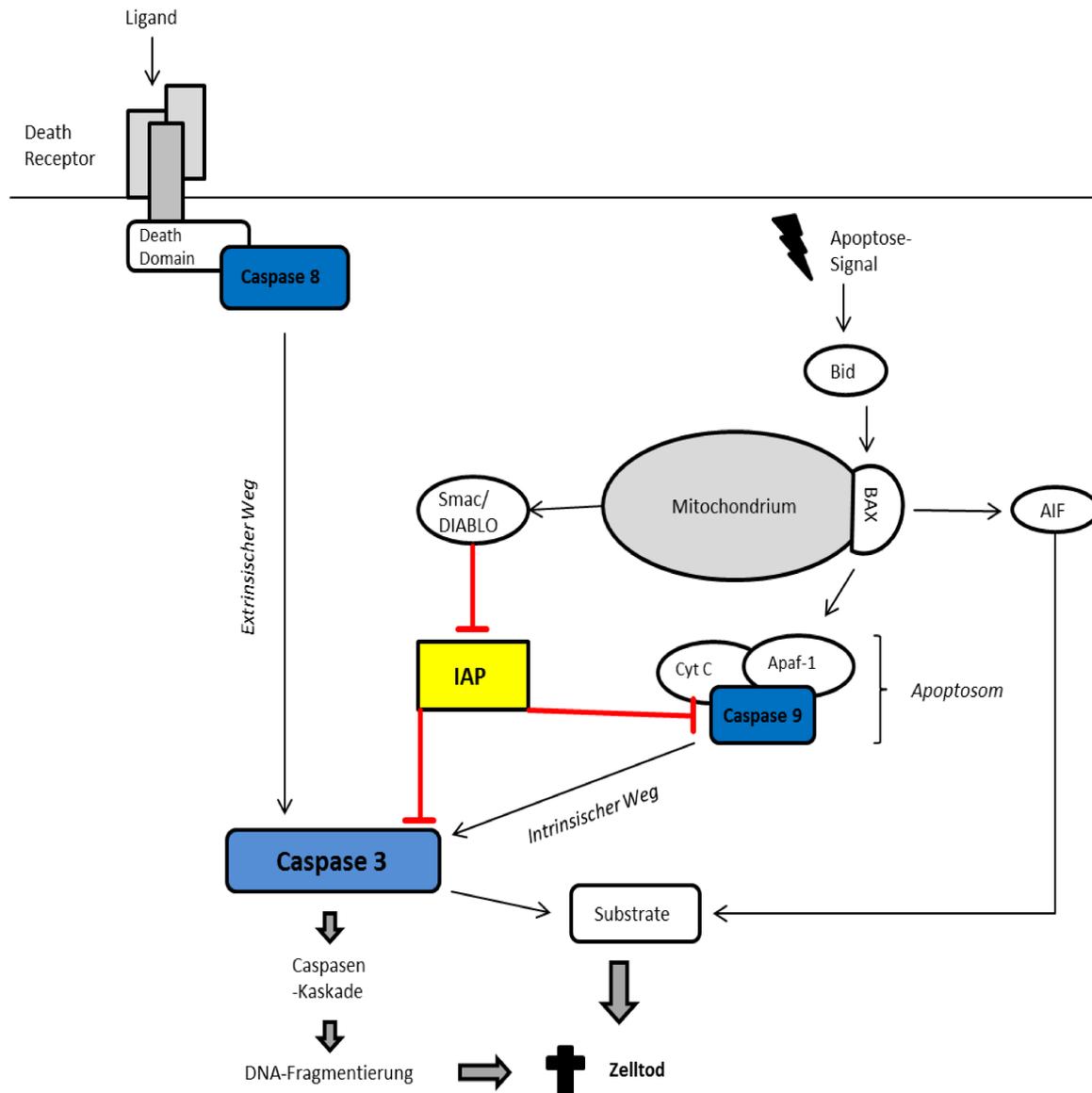


Abb. 1: Schematischer Ablauf der Apoptose (modifiziert nach Pecorino 2012 und Hiddemann 2010). Die Caspasen-abhängige Aktivierung der Apoptose ist über den Todesrezeptor-Signalweg und Caspase 8 (extrinsisch) und den Mitochondrien-Signalweg und Caspase 9 (Intrinsisch) möglich, wobei beide Signalwege die Effektorcaspasen aktivieren und so Apoptose induzieren. Caspasen-unabhängig kann die Apoptose durch AIF ausgelöst werden. AIF: Apoptosis Inducing Factor; Apaf: Apoptotic Protease Activating Factor; BAX: Bcl-2 associated X Protein; BID: BH3 interacting-domain death agonist; Cyt C: Cytochrom C; IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein; Smac: second mitochondrial-derived activator of caspases; DIABLO: Direct IAP-binding protein with low pI.

1.3 Die IAP- Familie: Target-Struktur in der Krebsforschung

Der *Inhibitor of Apoptosis Protein* (IAP) - Familie wird bei der Entstehung von Neoplasien und der Entwicklung einer Therapieresistenz gegen aktuelle Chemotherapeutika vermehrt große Bedeutung zugesprochen. Eine ihrer zentralen anti-apoptotischen Funktionen beruht auf einer Hemmung der Caspasen des Signalwegs des programmierten Zelltods [51].

1.3.1 Struktur und Funktion der IAPs

Die IAP-Familie besteht aus acht Mitgliedern (s. Abb. 2), denen per Definition eine Struktur gemeinsam ist: die BIR-Domäne (Baclovirus IAP Repeat). In jedem IAP-Molekül ein bis dreimal enthalten besteht eine BIR-Domäne aus ca. 70 Aminosäuren, die über Histidin- und Cysteinreste um ein Zinkmolekül organisiert sind [52]. Sie vermitteln Protein-Protein-Interaktionen, wobei BIR2 und BIR3 auch eine direkte Bindung an bestimmte Initiator- und Effektorcaspasen ermöglichen, die dadurch in ihrer apoptotischen Wirkung inhibiert werden [53]. Proteine können über ihre IBM (IAP Binding Motif) an die verschiedenen BIR-Domänen binden. Neben den Caspasen 7 und 9 ist auch Smac/DIABLO im Besitz einer IBM und kann so durch Bindung an ein IAP dessen Wirkung inhibieren und Apoptose induzieren [54, 55]. Zusätzlich enthalten einige IAPs eine RING-Domäne mit E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität und eine CARD (caspase recruitment domain), deren genaue Funktion noch nicht abschließend geklärt ist [41].

Als erstes von acht Mitgliedern der IAP-Familie wurde NAIP (neuronal apoptosis inhibitory protein)/BIRC1 bei der Erforschung der spinalen Muskelatrophie entdeckt [56]. Neben drei BIR-Domänen, die es als IAP kennzeichnet, enthält NAIP auch eine sog. NACHT-Domäne, welche nach ihrem Vorkommen in NAIP, C2TA, HET-E und TEP1 benannt ist und dort als Nukleosid-Triphosphatase (NTPase)-Domäne fungiert [57]. Zusammen mit den LRR (leucine-rich repeat) Regionen, welche als intrazelluläre Sensoren von Pathogenen (insb. Flagellin) dienen, kennzeichnet die NACHT-Domäne NAIP als Teil der NOD-like Receptor (NLR)- Familie und somit des angeborenen Immunsystems [58].

Die als BIRC2 und BIRC3 geführten Mitglieder cIAP (cellular IAP) 1 und 2 enthalten ebenfalls drei BIR-Domänen, sowie eine CARD, RING- und UBA (ubiquitin-associated) - Domäne und unterscheiden sich strukturell nur minimal voneinander [59]. Ihre Apoptose-inhibierende Wirkung erreichen sie zum einen über eine Hemmung des TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) - Signalweg, darüber hinaus regulieren sie über ihre BIR1-Domäne NFκB (Nuclear Factor κB) und sind in der Lage Smac zu binden [58, 60].

Apollon (BIRC6) ist das größte humane IAP (ca. 528 kDa), enthält eine BIR-Domäne und als einziges eine UBC (ubiquitin-conjugating) - Domäne [61]. Ihm wird eine Apoptose-

inhibierende Wirkung durch direkte Interaktion mit Caspase 9 und Smac zugeschrieben [60, 61]. ML-IAP (BIRC7) enthält ebenfalls eine BIR-Domäne, die für die Apoptose-Inhibition verantwortlich ist [60]. Weiterhin eine RING-Domäne, die zur Ubiquitination und dadurch zum Abbau von Smac führt [62]. Das letzte Mitglied der IAP-Familie ist ILP-2 (IAP-like Protein) (BIRC8), welches ebenfalls nur eine BIR-Domäne enthält und in gesundem Gewebe ausschließlich in den Hoden zu finden ist [63]. Die inhibitorische Wirkung beschränkt sich auf den intrinsischen Weg der Apoptose und wird durch Interaktion mit Caspase 9 vermittelt [63].

Die beiden berühmtesten und besterforschten humanen IAPs sind XIAP (X-linked IAP) (BIRC4) und Survivin (BIRC5). Da sie im Fokus dieser Arbeit stehen, werden sie im Folgenden ausführlich dargestellt.

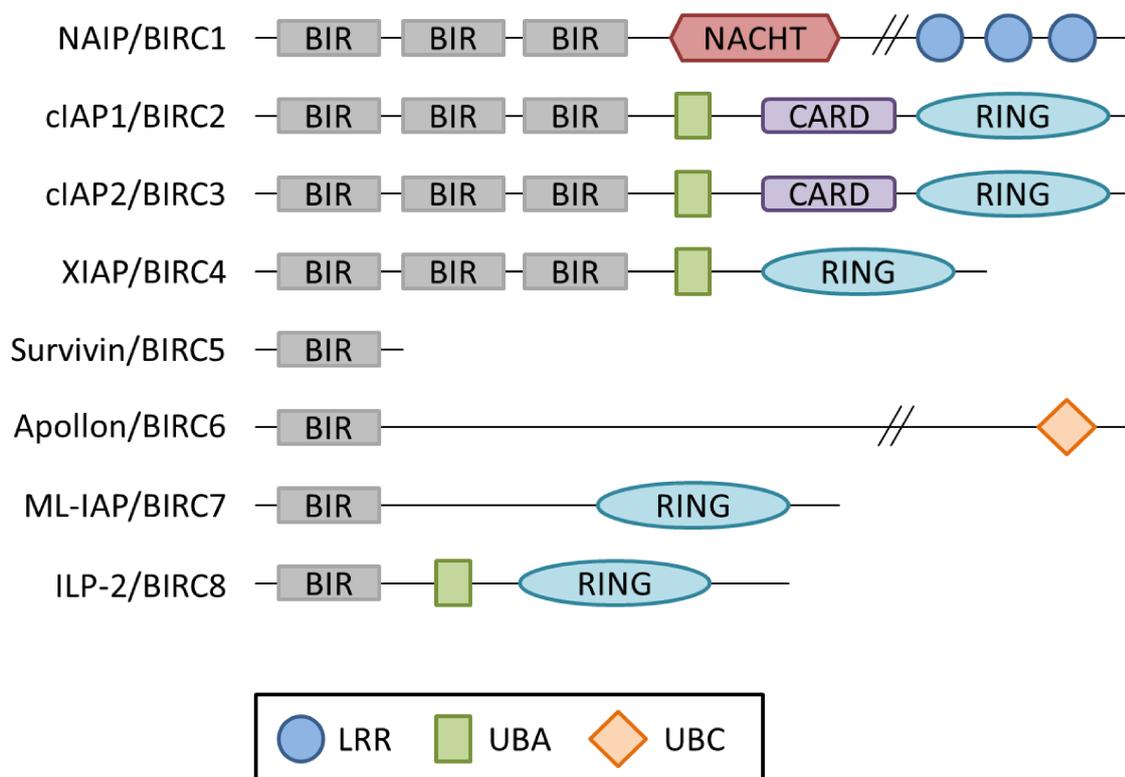


Abb. 2: Struktureller Aufbau aller bekannten Mitglieder der humanen IAP-Familie (modifiziert nach Finlay 2017 und Green 2011). Die BIR-Domänen stellen das zentrale Element der IAPs dar. Die humanen IAPs enthalten entweder eine (Survivin, Apollon, ML-IAP, ILP-2) oder drei BIR-Domänen (NAIP, cIAP-1, cIAP-2, XIAP). BIR, bacloviral IAP repeat; BIRC, bacloviral IAP repeat containing; cIAP, cellular IAP; CARD, caspase recruitment domain; IAP, inhibitor of apoptosis protein; ILP-2, IAP like protein 2; LRR, leucine rich repeat; ML-IAP, melanoma IAP; NAIP, neuronal apoptosis inhibitory protein; UBA, ubiquitin-associated; UBC, ubiquitin-conjugating; XIAP, X-linked IAP.

1.3.2 Survivin – mehr als ein Apoptose-Inhibitor

Survivin ist strukturell einzigartig unter allen IAPs: Es enthält nur eine BIR-Domäne, keine anderen Protein-Domänen und eine terminale α -Helix [50]. In Lösung bildet Survivin ein stabiles Homodimer [64]. In differenziertem Normalgewebe ist Survivin nicht nachweisbar, in fetalem Gewebe und Tumorgewebe fast aller bekannten Karzinomarten dagegen überexprimiert [50]. Eine Überexpression von Survivin in Tumorzellen ist mit Therapieresistenz, fortgeschrittenem Erkrankungsstadium und allgemein schlechtem *Outcome* assoziiert [65].

Seit der Entdeckung durch Ambrosini et al. 1997 wurden vielfältige Funktionen von Survivin in der Apoptose-Inhibition und Zellzyklus-Regulation erforscht (s. Abb. 3). Als Bestandteil des 'Chromosomal Passenger Complex' (CPC) zusammen mit Borealin, INCEP und Aurora B Kinase gehört Survivin zu den zentralen Regulatoren der Mitose [66]. Aber auch über direkte Bindung an polymerisierte Mikrotubuli trägt Survivin zur Stabilisation des Spindelapparates bei [67]. Seine Apoptose-inhibierende Wirkung kann Survivin auf verschiedene Weisen ausüben. Über Komplexbildung mit XIAP kann Survivin direkt an die Initiator-Caspase 9 binden und so die Apoptose inhibieren. Eine Caspase-unabhängige Apoptose-Inhibition bewirkt Survivin über die Hemmung der Freisetzung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) aus den Mitochondrien [68]. Darüber hinaus reguliert Survivin Ku70 [69, 70], ein Bestandteil des Ku-Heterodimers (Ku70/Ku80), welcher über den NHEJ (nonhomologous end-joining) - Signalweg an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt ist [71]. Weiterhin steht Survivin in Wechselwirkung mit drei Heat-Shock-Proteinen (Hsp90, Hsp 60 und AIP), welche es vor Abbau durch Proteasomen schützen und so die intrinsische Apoptose inhibieren [41, 72-74]. Dieser Überblick suggeriert eine Vielzahl von Möglichkeiten, um Zielstrukturen für neue Therapiemöglichkeiten mit Survivin-Inhibitoren in der Krebsforschung zu identifizieren.

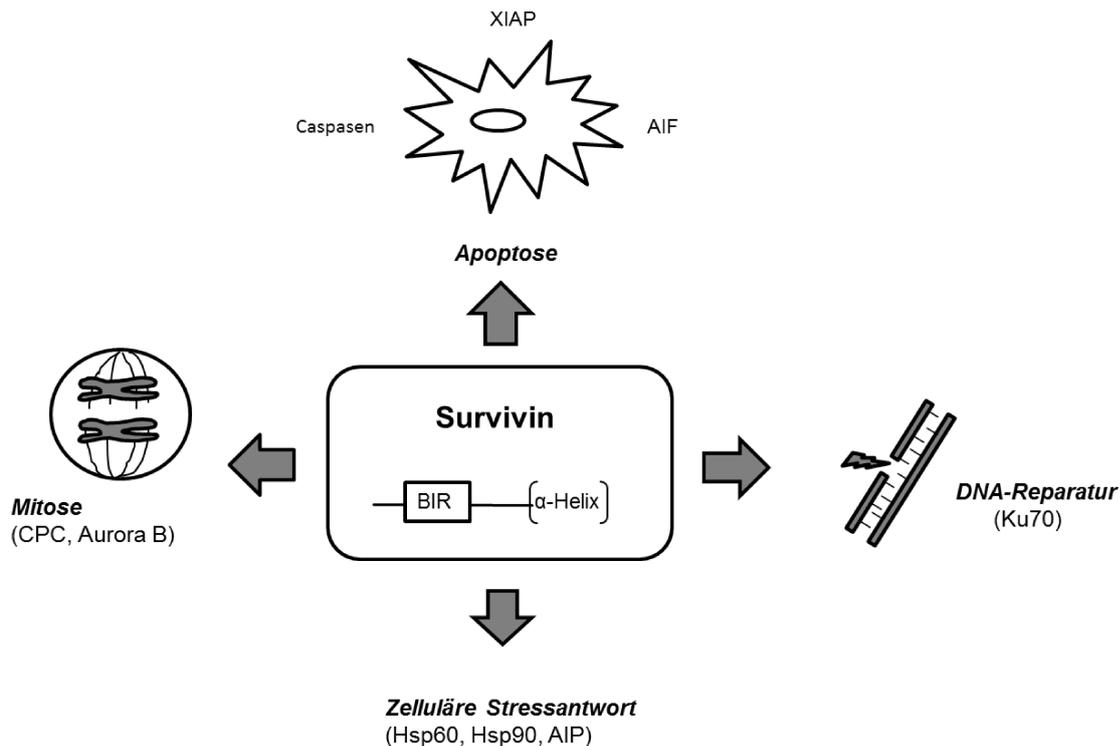


Abb. 3: Funktionen von Survivin (modifiziert nach Coumar et al. 2013). AIF: Apoptosis Inducing Factor; AIP: Aryl Hydrocarbon Receptor – Interacting Protein; BIR: Baclovirus IAP repeat; CPC: Chromosomal Passenger Complex; Hsp: Heat Shock Protein; XIAP: X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

Es hat sich gezeigt, dass auch nur kleine Veränderungen dieser ineinander verzahnten Abläufe, in die Survivin eingebunden ist, zu Zelluntergang führen können und betroffene Krebszellen sich von einer Veränderung der molekularen Struktur oder einem kompletten Verlust von Survivin nicht erholen können [75]. Dank der selektiven Expression von Survivin in Tumorgewebe [50] zeigen erste klinische Studien mit Survivin-Inhibitoren gute Verträglichkeit und moderate Nebenwirkungen [75].

1.3.3 XIAP: ein direkter Caspase-Inhibitor

XIAP (X-linked IAP) enthält im Unterschied zu Survivin drei BIR-Domänen und eine RING-Domäne (s. Abb. 4) und ist der einzige direkte Inhibitor von Caspasen *in vivo* [53]. Über BIR2 bindet XIAP an die Effektorcaspasen 3 und 7 [76], über BIR3 an die Initiatorcaspase 9 [77] und inhibiert so den Vorgang der Apoptose. Ein Inhibitor der IAPs, Smac/DIABLO, konkurriert mit den Caspasen um die Bindungsstellen an BIR2 und BIR3 [78, 79]. Smac/DIABLO bindet dabei mit hoher Affinität an die BIR-Domäne, sodass vorher gebundene Caspasen freigegeben werden und die Apoptose erfolgen kann [78]. Kleine Moleküle, sog.

‚Smac Mimetics‘ imitieren die pro-apoptotische Funktion von Smac/DIABLO und werden als neue Therapeutika in der Krebsbehandlung getestet [80]. Des Weiteren moduliert XIAP die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B (Nuclear Factor κ B) [41]. Der I κ BK (Inhibitor of NF κ B – Kinase) / NF κ B – Signalweg fördert das Zellüberleben durch Transkription bestimmter Gene, deren Produkte Apoptose-inhibierend wirken [81]. XIAP interagiert über seine BIR1-Domäne mit TAB1 (Tak1-binding Protein), welche die TAK1 (TGF β -activating Kinase) aktiviert, wodurch es zum Abbau von I κ B und folglich zur Aktivierung von NF κ B kommt [82]. In Krebszellen korreliert NF κ B mit einem aggressiven Krankheitsverlauf [83], sodass eine IAP-vermittelte NF κ B-Aktivierung direkt mit Tumorprogression und Metastasierung in Verbindung gebracht werden kann [84].

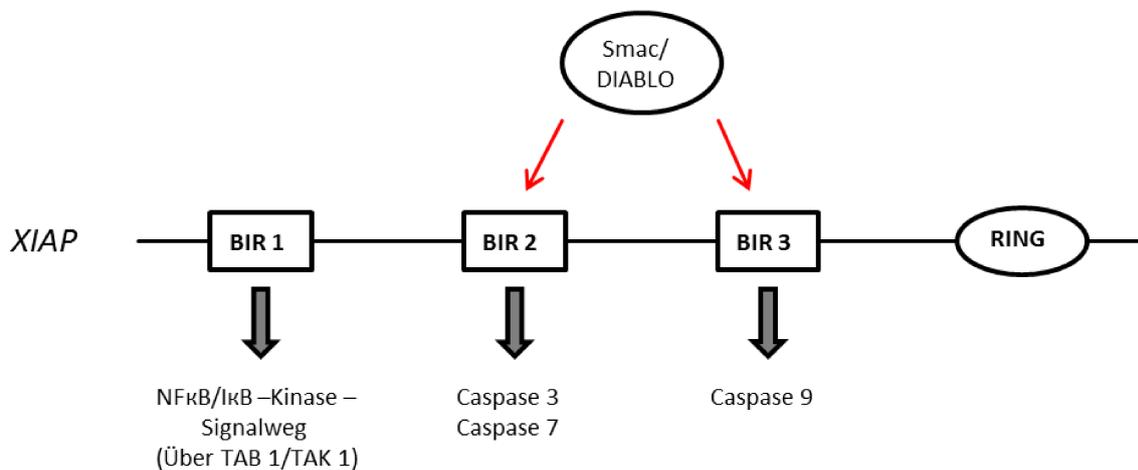


Abb. 4: Aufbau von XIAP und Funktion der BIR-Domänen. BIR: Baculovirus IAP Repeat; DIABLO: Direct IAP-binding protein with low pI; I κ BK: Inhibiting κ B – Kinase; NF κ B: Nuclear Factor κ B; Smac: second mitochondrial-derived activator of caspases, TAB1: Tak1-binding Protein; TAK1: TGF β -activating Kinase

1.3.4 Survivin und XIAP in Tumoren

Die Dysregulation der IAP-Expression ist oftmals mit dem Auftreten verschiedenster Tumore assoziiert, wo sich stark erhöhte Proteinlevel in den veränderten Zellen nachweisen lassen [41].

Survivin ist in allen bisher untersuchten menschlichen Tumoren überexprimiert, wohingegen es in Normalgewebe kaum nachweisbar ist [65] - im Gegensatz zu allen anderen IAPs, die durchaus in gesundem Gewebe zu finden und in Tumoren verstärkt exprimiert werden. Diese Überexpression von Survivin ist dabei mit Therapieresistenz, Metastasierung und schlechtem Outcome assoziiert [65]. Survivin erhöht in Tumorzellen die Resistenz gegenüber zahlreichen Chemotherapeutika und Bestrahlungs-assoziiertes Apoptose [85], zudem lässt sich ein erhöhtes Survivin-Level in gesunden Endothelzellen von Blutgefäßen nachweisen, die für Tumorangiogenese verantwortlich sind [86]. Survivin eignet sich somit sowohl als diagnostischer, als auch als prognostischer Marker in verschiedenen Karzinomen [85]. Das macht Survivin zu einer wertvollen Zielstruktur in der Krebsforschung. Zurzeit werden mehrere Survivin-Inhibitoren erforscht: YM155 beispielsweise supprimiert die Survivin-Promotoraktivität [70]. M4N dagegen ist ein Transkriptionsrepressor mit Survivin als Zielstruktur und kontrolliert dadurch den Zellzyklus, Tumorprogression und Apoptose [87]. Von der Kombination dieser Targets mit herkömmlichen Therapieregimen verspricht man sich einen Fortschritt vor allem in der Bekämpfung der bislang therapieresistenten Tumoren.

XIAP hat wie oben beschrieben im Gegensatz zu Survivin die Möglichkeit der direkten Caspase-Inhibition, was es zu einem attraktiven Ziel der Antagonisierung im Rahmen einer Krebstherapie macht [52]. Eine hohe XIAP-Expression ist in vielen Karzinomarten bereits nachgewiesen, dort aber nicht immer mit einem schlechten Outcome verbunden [88]. So scheint XIAP in verschiedenen Karzinomarten unterschiedliche Rollen zu spielen, sodass es als Biomarker durchaus geeignet ist, die gezielte Inhibition jedoch in jedem Tumor einzeln zu evaluieren ist [88]. Für ausgewählte Tumore ist XIAP mit anderen IAPs doch bereits eine wichtige Zielstruktur in der Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten geworden, da seine BIR-Domänen als zentraler Punkt der anti-apoptischen und Caspase-inhibierenden Funktion von IAPs angesehen werden [60]. Smac als natürlicher Antagonist dient dabei als Vorlage für die sogenannten Smac-Mimetics [89]. Sie ermöglichen eine effektive Antagonisierung insbesondere der BIR3-Domäne von XIAP und somit eine Inhibition von Caspasen [89]. Es existieren bereits mehrere Studien, sowohl präklinisch als auch klinisch, die die Wirkung dieser Smac-Mimetics untersuchen [90], die Ergebnisse differieren jedoch stark [59]. Ein Beispiel ist Birinapant, welches in Studien intravenös alleine oder in Kombination mit Chemotherapeutika verwendet wurde [91].

XIAP kann über seine BIR-Domänen eine Protein-Protein-Interaktion mit Survivin eingehen [92]. Diese führt zu einer erhöhten Stabilität von XIAP gegenüber Ubiquitinierung und proteasomalem Abbau, sowie zu synergistischen Effekten in der Inhibition von Caspase 9 [92]. Survivin alleine ist im Gegensatz dazu nicht in der Lage Caspasen direkt zu inhibieren [41]. Ein erhöhtes Tumorwachstum *in vivo* konnte im Zusammenhang mit XIAP-Survivin-Komplexen nachgewiesen werden [93]. Die Ausschaltung von Survivin dagegen führt in Tumorzellen zu XIAP-Abbau und Caspasen-Aktivierung [94] und somit zur Aktivierung von Apoptose. Darüber hinaus stimuliert der XIAP-Survivin-Komplex die Tumorzell-Invasion und Metastasierung durch Aktivierung von NFκB [84]. Mehrotra et al. haben somit IAPs als Gene identifiziert, die direkt für die Metastasierung mitverantwortlich sind und als Angriffspunkt gerade für Patienten in lokal fortgeschrittenen oder bereits metastasierten Tumorstadien dienen können [84].

1.3.5 Stand der Forschung: Survivin und XIAP im Ösophaguskarzinom

Es liegen bereits mehrere Studien vor, die sich mit der Expression und Bedeutung von XIAP und Survivin im Ösophaguskarzinom beschäftigen. In diesem Kapitel soll ein kurzer Überblick gegeben werden, um in der Diskussion ausgewählte Studien näher zu beleuchten.

Der Großteil der Forschung zu Survivin bezieht sich auf das Plattenepithelkarzinom (ESCC). Li et al. fassten 2012 sieben dieser Studien in einer Metaanalyse zusammen, um die teils kontroversen Ergebnisse zusammenzutragen und zu bewerten. Die nukleäre Survivin-Expression im ESCC wurde als unabhängiger, negativ prognostischer Faktor anerkannt, während die zytoplasmatische Survivin-Expression mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium korrelierte [95]. Neben der Wertigkeit von Survivin als prognostischer Marker im ESCC, wurde auch bei der Untersuchung der präoperativen Blutlevel von Survivin eine Korrelation mit einem kürzeren Gesamtüberleben gefunden [96]. Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass eine Überexpression von Survivin mit einem schlechten Ansprechen auf Radiotherapie assoziiert ist [97]. Dies macht Survivin zu einer interessanten Zielstruktur. Durch die Runterregulation von Survivin auf RNA-Ebene konnte bereits eine Inhibition des Tumorzellwachstums in einigen ESCC-Zelllinien erreicht werden [98]. Im Adenokarzinom des Ösophagus (EAC) ist die Survivin-Expression noch nicht so ausführlich erforscht. Es zeigen sich dort teils gegensätzliche Ergebnisse bezüglich der prognostischen Wertigkeit von Survivin [99, 100].

Für XIAP liegen lediglich Daten zur Expression im ESCC. Dort ist eine Überexpression positiv mit Tumorprogression und einer schlechten Prognose assoziiert [101]. In einigen ESCC-Zelllinien konnte durch Reduktion von XIAP Apoptose induziert werden [102, 103]. Die Behandlung der Zellen zur XIAP-Repression wurde mit verschiedenen Chemotherapeutika

kombiniert und so eine erhöhte Chemosensibilität der Zellen erreicht [103]. Weiterhin wurde ebenfalls eine erhöhte Radiosensibilität nach Reduktion von XIAP in ESCC-Zelllinien erreicht [104]. Zu der Expression und Bedeutung von XIAP im Adenokarzinom des Ösophagus (EAC) liegen bisher keine Daten vor.

Auch die Co-Expression dieser beiden wichtigen IAPs, die wie oben beschrieben in einem Protein-Protein-Komplex zusammenarbeiten, wurde bisher weder im ESCC, noch im EAC untersucht.

2. Ziele der Arbeit

Das Ösophaguskarzinom ist eine häufige Tumorerkrankung in Deutschland, deren Prognose gerade im fortgeschrittenen Stadium immer noch sehr schlecht ist. Radiochemotherapie ist neben der chirurgischen Resektion eine der wenigen Therapiemöglichkeiten und wird immer wieder durch Resistenzen des Tumors in ihrer Wirksamkeit limitiert.

Es ist daher viel in die Erforschung alternativer Behandlungsansätze investiert worden. Eine zentrale Rolle spielt dabei die IAP-Familie. Gerade ihr kleinster Vertreter Survivin ist in vielen Karzinomen stark exprimiert und wird als Zielstruktur neuer Krebstherapeutika gehandelt. Es gibt bereits Untersuchungen, die die Expression von Survivin im Ösophaguskarzinom untersucht haben. Allerdings keine Studie, die beide histologische Typen, das Plattenepithel- und das Adenokarzinom, gleichzeitig untersucht. Als weiteres Mitglied der IAP-Familie wird XIAP und seine Expression im Tumorgewebe des Ösophagus untersucht. XIAP gilt als einziger direkter Caspase-Inhibitor und ist in der Lage mit Survivin im Komplex zusammenzuarbeiten. Ein Ziel der Arbeit ist daher einen vollständigen Überblick über die zytoplasmatische und nukleäre Survivin - Expression in Plattenepithel- und Adenokarzinom des Ösophagus zu erhalten und gleichzeitig die XIAP-Expression in Gewebeproben zu bestimmen und damit zu vergleichen. Auch sollen die Unterschiede zwischen Tumorinvasionsfront, Tumorzentrum und Lymphknotengewebe in Bezug auf ihre IAP-Expression untersucht werden.

Die Inhibition von IAPs bildet den Ansatzpunkt neuer Krebstherapeutika. Einige befinden sich bereits in klinischen Studien, andere sind noch weitestgehend unerforscht auf dem Gebiet des Ösophaguskarzinoms. In einem zweiten Teil des Projekts werden die Einflüsse verschiedener IAP-Inhibitoren auf Krebszellen des Ösophagus getestet.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Hera Cell	Heraeus
Thermostatic Waterbath WBS	Fired Electronic
HeraSafe KS	Thermo Scientific
Pipetboy	Integra Biosciences
Universal 30 RF	Hettich LABTechnology
Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Scientific
BioPhotometer	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf
Zählkammer	Neubauer
Wilovert A	Hund WETZLAR
Infinite M200	Tecan
Mini-PROTEAN™ Tetra-Cell	BioRad
Criterion Blotter	BioRad
PowerPac HC	BioRad
KS 250 basic	Ika Labortechnik
Versa Doc Modell 400	BioRad
Forma 405	Thermo Electron Corporation
Sparkfree Laboratory Freezer	Thermo Electron Corporation
SU1400	Sunlab

3.1.2 Plastikwaren und Einwegartikel

Plastikwaren und Einwegartikel wurden von den Firmen Eppendorf, Falcon, StarLab und Costar bezogen.

3.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Xylol reinst	Merck
DPBS	Gibco
H ₂ O ₂	Merck
Antibody Diulent	Zytomed Systems
Mayers Häkalaun	Merck
Ethanol	VWR Chemicals
Aqua dest.	Gibco
Entellan	Merck
Liquid Blocker Super Pap Pen	MBT Brand
1x PBS-Tabletten	Gibco
Tween 20	Sigma
YM 155	Sellekchem
AT406	Sellekchem
M4N	Sellekchem
GDC	Sellekchem
Brinapant	Sellekchem
DMSO	SIGMA
CellTiter 96®AqueousOne Solution Reagent	Promega
RIPA-Puffer	Sigma
cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Laemmli Sample Buffer	BioRad
BioRad Bradford 1x Dye Reagent	BioRad
Bovine Serum Albumin Fraction (BSA)	Sigma
Tris P.A.	Merck
Glycin	Merck
SDS (Sodiumdodekyl-Sulfat)	SIGMA
30% acrylamide mix	BioRad
Tris-Hydrochlorid	AppliChem
Ammonium Persulfate	SIGMA
TEMED	SIGMA
Precision Plus Protein Western C Standards	BioRad
100% Magermilchpulver	Nestle
Panceau S Pulver	Sigma
Precision Protein Streptacin HRP conjugate	BioRad

Clarity™ Western ECL Substrate

BioRad

3.1.4 Molekularbiologische Kits

Bezeichnung	Hersteller
ZytoChem-Plus HRP Kit, Broad Spectrum	Zytomed Systems
DAB Substrate Kit High Contrast	Zytomed Systems
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche
BioRad ECL Detection Kit	BioRad

3.1.5 Puffer und Lösungen

Retrieval Solution: 10mM Natrium-Citrat-Puffer (3mg Tri-Natriumcitrat-Dihydrat auf 1L Aqua dest.)

H₂O₂-PBS: 3% H₂O₂ in 1x PBS

Waschpuffer HRP: PBS + 0,1% Tween 20

DAB-Substrat Fünf Tropfen DAB Chromogen in eine Flasche DAB-Substrat

Protease-Inhibitor

- a) Stocklösung: Eine Tablette cOmplete in 2ml Aqua dest.
- b) Arbeitslösung: Stocklösung und RIPA-Puffer 1:25 vermengen

10xSDS-Laufpuffer 250mM Tris

Westernblot 1,9 mM Glycin
10 g SDS
Ad Aqua dest.

10x Transferpuffer 192 mM Glycin

Westernblot 25 mM Tris

<i>1x Transferpuffer</i>	10% 10x Transferpuffer
<i>Westernblot</i>	20% Methanol
	Ad Aqua dest
<i>10x TBS Waschpuffer</i>	1,5 M NaCl
<i>Westernblot</i>	100 mM Tris
	Ad Aqua dest
	pH 7,5
<i>1x TBS-T Waschpuffer</i>	1x TBS
<i>Westernblot</i>	0,1% Tween 20
<i>Westernblot-</i>	5% Milchpuler
<i>Blockadereagenz</i>	Ad 1x TBS-T
<i>Panceaurot-Färbelösung</i>	0,5 g Ponceau S Pulver
	100ml 5% Essigsäure
<i>ECL-Lösung</i>	Peroxide Solution + Luminol/Enhancer Solution (1:1)
	aus BioRad ECL Detection Kit
<i>BrdU labeling solution</i>	1% BrdU labeling reagent
	99% steriles Medium
<i>Anti-BrdU-POD stock</i>	Anti-BrdU-POD in 1,1ml Aqua dest.
<i>solution</i>	
<i>Anti-BrdU-POD working</i>	1% Anti-BrdU-POD stock solution
<i>solution</i>	99% Antibody dilution solution

3.1.6 Antikörper

3.1.6.1 Primärantikörper

Antigen	Charakteristika	Host	Hersteller	Verdünnung bei Verwendung im Western Blot
ciAP1	mAb, IgG	Rabbit	Novus Biologicals	1:1000
ciAP2	mAb, IgG	Rabbit	Novus Biologicals	1:1000
Dako X0903	IgG	Rabbit	DakoCytomation	1:15000
GAPDH	mAb, IgG1	Mouse	abcam	1:5000
MOPC 21	mAb, IgG1	Mouse	SIGMA	1:70
PARP	mAB, IgG	Rabbit	CellSignaling	1:1000
Survivin	mAB, IgG	Rabbit	Novus Biologicals	1:1000
Tubulin	mAB, IgG	Mouse	SIGMA-ALDRICH	1:5000
XIAP	mAB, IgG	Mouse	BD Transduction Laboratories	1:1000

3.1.6.2 Sekundärantikörper

Antigen	Charakteristika	Host	Hersteller
Anti-Rabbit HRP	IgG	Rabbit	CellSignaling
Anti-Mouse (Fc-specific) Peroxidase	IgG	Mouse	SIGMA

3.1.7 Zellkulturmedien

Gibco® RPMI 1640(1x) + GlutaMAX versetzt mit 10 % FCS (Fetal Calf Serum), 100 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin

Gibco® 0,05%-Trypsin EDTA (1x)

Gibco® Trypan Blue Stain (0,04%)

3.1.8 Zelllinien

Die ESCC-Zelllinien KYSE30, KYSE270, KYSE410 und KYSE520 erhielten wir von der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig. Die EAC-Zelllinien OE19 und OE33 wurden bei der europäischen Sammlung von Zellkulturen (ECACC, Salisbury, UK) erworben.

Zelllinie	Histologie	Lokalisation	Geschlecht	Alter des Patienten
K30	Plattenepithelkarzinom	Mittlerer, intrathorakaler Ösophagus	Männlich	64
K270	Plattenepithelkarzinom	Mittlerer, intrathorakaler Ösophagus	Männlich	79
K410	Plattenepithelkarzinom	Zervikaler Ösophagus	Männlich	51
K520	Plattenepithelkarzinom	Unterer, intrathorakaler Ösophagus	Weiblich	58
OE19	Adenokarzinom	Ösophago-gastraler Übergang	Männlich	72
OE33	Adenokarzinom	Unterer Ösophagus	Weiblich	73

3.1.9 Patientenselektion und klinisch-pathologische Daten

Es wurden Gewebeproben aus den pathologischen Instituten der Universitäten Köln und Düsseldorf von insgesamt 210 Patienten verwendet, 168 davon männlich und 54 weiblich. Das Alter bei Operation lag im Durchschnitt bei 60,8 Jahren, der Median betrug 60. In die Studie wurden Patienten nach radikaler En-Bloc-Ösophagektomie und Lymphadenektomie mit kurativem Ansatz unabhängig von Tumorstadium oder mikroskopischen Resektionsgrenzen aufgenommen, die zwischen 1986 und 2005 an den Universitätskliniken Düsseldorf oder Köln operiert wurden. Ausschlusskriterium waren neoadjuvante Therapien, R2-Resektionsstatus, Tumoren anderen histologischen Ursprungs als EAC oder ESCC. Zusätzlich wurden 72 Proben tumornahen Normalgewebes untersucht. Informationen zu TNM-Stadium und Grading wurden retrospektiv den originalen pathologischen Berichten entnommen. Es lag ein positives Ethikvotum zur Verwendung der Gewebeproben vor (Studennummer 2316 und 3821).

3.1.10 Software

Bei der Datenerhebung wurden die Programme iconcontrol Version 1.9 und Quantity One Basic Version 4.6 verwendet. Zur Datenauswertung wurden die Programme GraphPad Prism 5 für Windows und IBM SPSS Statistics 23 verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von adhärennten Zellen

Die verwendeten Zelllinien des Ösophagus wurden in Gibco® RPMI 1640(1x) + GlutaMAX kultiviert und im Brutschrank bei 5% CO₂ und 37°C gelagert. Bei ausreichendem Bodenwuchs von circa 80% wurden die Zellen zur Passagierung einmal mit PBS gewaschen und durch 0,05% Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst.

3.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte durch Anwendung der Neubauerzählkammer [105]. Zunächst wurden Zellen durch Passagierung gewonnen und in einer bestimmten Menge Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 zur Färbung mit Trypanblau versetzt und zur Doppelbestimmung auf beide Seiten der Neubauerzählkammer aufgetragen. Die Zellzahl wurde durch Auszählung der vier Eckquadrate in folgenderweise bestimmt:

Länge eines Quadrats: 1mm

Höhe eines Quadrats: 0,1mm

Fläche eines Quadrats: 1mm²

Volumen eines Quadrats: 0,1mm³

Formel zur Bestimmung der Lebendzellzahl:

$(\text{Zellzahl}/4) \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Zellzahl}/1\text{ml}$

3.2.3 CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Der CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay dient der Bestimmung der Anzahl von lebenden, proliferierenden Zellen in einer Probe. Dabei wird der Bestandteil MTS, ein Tetrazolium Compound, von proliferierenden Zellen zu einem farbigen Formazanprodukt umgesetzt. Die Intensität dieser farblichen Veränderung kann über Extinktion gemessen werden. Im Folgenden wurde der Einfluss verschiedener Compounds auf die Proliferationsrate getestet.

3.2.3.1 Vorbereitung zum Proliferationsassay

Vor Durchführung eines Proliferationsassays wurden die Zelllinien mit verschiedenen Compounds unterschiedlicher Konzentrationen (s. Tabelle 4) behandelt. Dazu wurden 2000 Zellen/well der Zellsuspension in Medium auf eine 96well-Platte aufgebracht und bis zum Erreichen eines fast konfluierenden Zellrasens bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nun wurde der

Überstand per Vakuumsaugpumpe entfernt und 100µl/well der Compoundlösung aufgetragen. Drei wells wurden dabei mit Lösung identischer Konzentration befüllt. DMSO, das Lösungsmittel der Compounds, war in entsprechenden Konzentrationen als Negativkontrolle mitzuführen. Nach 48 Stunden Inkubationszeit konnte die Durchführung des gewünschten Assays erfolgen.

Tabelle 4: Endkonzentrationen und Lösungsmittel der verwendeten Compounds im CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay.

Substanz	Lösungsmittel	Endkonzentration
YM 155	Gibco® RPMI 1640(1x) + GlutaMAX	0,1nM; 0,3nM; 1nM; 3nM; 10nM; 30nM; 100nM; 300nM; 1µM; 3µM; 10µM
M4N	Gibco® RPMI 1640(1x) + GlutaMAX	30nM; 100nM; 300nM; 1µM; 3µM; 10µM; 30µM; 100µM; 300µM; 1mM
AT406	Gibco® RPMI 1640(1x) + GlutaMAX	3nM; 10nM; 30nM; 100nM; 300nM; 1µM; 3µM; 10µM
GDC	Gibco® RPMI 1640(1x) + GlutaMAX	3nM; 10nM; 30nM; 100nM; 300nM; 1µM; 3µM; 10µM
Birinapant	Gibco® RPMI 1640(1x) + GlutaMAX	3nM; 10nM; 30nM; 100nM; 300nM; 1µM; 3µM; 10µM

3.2.3.2 Durchführung des CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay

Das CellTiter 96® AQueous One Solution Reagenz wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Es wurden 20µL Reagenz in jedes well der vorbereiteten 96well-Platten gegeben, die die Proben in 100µl Compoundlösung enthielten. Anschließend wurden die Platten lichtgeschützt bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Messungen wurden mehrfach im Zeitraum von 30 Minuten bis zu drei Stunden durchgeführt, abhängig von der Farbentwicklung. Die Extinktion wurde im Infinite M200 bei 490nm mit einer Referenzwellenlänge von 650nm gemessen.

3.2.4 Zellproliferations-ELISA

Der Zellproliferations-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbend Assay) quantifiziert die Zellproliferation durch Messung des BrdU (5-Brom-2-Desoxyuridin) - Einbaus während der DNA-Synthese von proliferierenden Zellen. BrdU ist ein Pyridin-Analogon, das anstelle von

Thymidin in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut wird. Nach dem Einbau in die DNA kann BrdU durch einen Immunoassay detektiert werden.

3.2.4.1 Vorbereitungen zum Zellproliferations-ELISA

Die Vorbereitungen zum Zellproliferations-ELISA entsprechen denen für den CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (s. 2.2.3.1). Es wurden jedoch abweichende Konzentrationen und Compounds verwendet (s. Tabelle 4).

Tabelle 5: Endkonzentrationen und Lösungsmittel der verwendeten Compounds im Zellproliferations-ELISA.

Substanz	Lösungsmittel	Endkonzentration
YM155	Gibco® RPMI 1640(1x) + GlutaMAX	0,1nM; 1nM; 10nM; 100nM; 1µM; 10µM
M4N	Gibco® RPMI 1640(1x) + GlutaMAX	100nM; 1µM; 10µM; 100µM; 1mM

3.2.4.2 Durchführung des Zellproliferations-ELISA

Auf die vorbereiteten 96well-Platten wurden 10µl/well BrdU-Labeling Solution gegeben und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In diesem Zeitraum erfolgte der Einbau von BrdU in die DNA der proliferierenden Zellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Labeling Medium entfernt und 200µl/well FixDenat Lösung hinzugegeben, um die DNA zu denaturieren. Nach 30 Minuten Inkubation bei einer Raumtemperatur zwischen 15 und 25°C konnte die FixDenat-Lösung entfernt werden. Im Anschluss wurden 100µl/well anti-BrdU-POD working solution auf die Proben gegeben und wiederum bei Raumtemperatur für 90 Minuten inkubiert, sodass eine Bindung des Antikörpers an das in der DNA fixierte BrdU ermöglicht wurde. Nach Entfernen des Antikörper-Konjugats wurden die Proben drei Mal mit jeweils 200-300µl/well PBS gewaschen. Anschließend wurde die PBS-Lösung entfernt und 100µl/well Substrate Solution hinzugefügt. Diese enthält Tetramethylbenzidin (TMB), welches an die gebildeten Immunkomplexe bindet und eine Farbreaktion hervorruft. Die Proben wurden bei Raumtemperatur bis zur Entwicklung einer ausreichenden Farbreaktion inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 370 nm bei einer Referenzwellenlänge von 492 nm.

3.2.5 Proteinchemische Methoden

3.2.5.1 Vorbereitung zur Proteinisolation

Vor Beginn der Proteinisolation wurden einige Proben zuvor mit YM155 in den Konzentrationen 100nM, 30nM und 10nM behandelt. DMSO, das Lösungsmittel der Compounds, wurde in gleichen Konzentrationen als Negativkontrolle mitgeführt. Es wurden Proben aller Zelllinien in Zellkulturflaschen von 75cm² kultiviert bis zu einem Bodenwuchs von circa 80%. Nach einer Spülung mit PBS wurde Medium hinzugegeben, das mit der gewünschten Konzentration des Compounds oder der Negativkontrollen versetzt war. Es konnte nach 24 Stunden Inkubationszeit mit der Proteinisolation begonnen werden.

3.2.5.2 Proteinisolation aus Zellkultur

Die Proteinisolation erfolgte aus nach oben beschriebenem Schema behandelten Zellen aller verwendeten Ösophaguszelllinien. Zur Gewinnung der adhärennten Zellen wurden diese zunächst mit Hilfe von Trypsin gelöst und das nach Zentrifugation entstandene Zellpellet mit PBS gewaschen. Nach Resuspension in 100 bis 250µl RIPA-Puffer wurden die Lysate für 15 Minuten auf Eis gelagert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 13.000 rpm und 4°C. Der entstandene Überstand wurde in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

3.2.5.3 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford [106] mit Hilfe des Proteinassays der Firma Bio-Rad. Zur Messung wurden 2µl der Probe mit 798µl H₂O und 200µl BiodRad Dye versetzt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der enthaltene Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau bindet an die in der Probe enthaltenen Proteine und hat somit sein Absorptionsmaximum bei 595 nm. Die gemessene Absorbtionszunahme bei 595 nm konnte somit als Maß für die Proteinkonzentration der Probe gewertet werden. Voraussetzung dafür war eine vorrausgehende Kalibrierung mit dem Standardprotein BSA (Bovine Serum Albumin).

3.2.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

3.2.5.4.1 Herstellung der Gele

Die Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele erfolgte in mit Ethanol gereinigten Glasplatten, die eine Gelbreite von 1,5mm erzeugten. Zunächst wurden 10 ml der Lösung für das Trenngel in die gläsernen Spacer eingefüllt und härteten für circa eine halbe Stunde bei Raumtemperatur aus (Zusammensetzung s. Tabelle 6). 8%tige Gele wurden dabei für den

Antikörper PARP gewählt, 10%tige Gele für XIAP, CIAP 1 und CIAP 2 und 15%tige Gele für Survivin.

Tabelle 6: Zusammensetzung der SDS-Trenngele bei 10ml Gesamtvolumen pro Gel.

Substanz	8% Gel	10% Gel	15% Gel
H₂O	4,6 ml	4 ml	2,3 ml
30% Acrylamid-Mix	2,7 ml	3,3 ml	5 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,006 ml	0,004 ml	0,004 ml

Nach Aushärtung der Trenngele wurden 4 ml der Lösung für das Sammelgel (Zusammensetzung s. Tabelle 7) aufgetragen und ein Kamm mit 10 oder 15 Kammern eingesetzt. Sobald das Sammelgel ebenfalls ausgehärtet war, konnte das Gel für die Gelelektrophorese verwendet werden.

Tabelle 7: Zusammensetzung des SDS-Sammelgels bei 4ml Gesamtvolumen pro Gel.

Substanz	4ml Gelvolumen
H₂O	2,7 ml
30% Acrylamid-Mix	0,67 ml
1,0 M Tris (pH 6,8)	0,5 ml
10% SDS	0,04 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,04 ml
TEMED	0,004 ml

3.2.5.4.2 Durchführung der SDS- Acrylamid-Gelelektrophorese

Zur Durchführung der SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese wurde die Methode nach Laemmli (1970) gewählt. Die Proteinproben von je 20 µg wurden auf ein Volumen von 15 µl mit H₂O aufgefüllt und mit 3 µl 6-fach Laemmli-Puffer versetzt. Zur Denaturierung wurden die Proben fünf Minuten bei 95°C gekocht. Anschließend konnten die Proben auf die Gele aufgetragen werden. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte 30 Minuten bei 90V, danach wurde die Spannung für 60 Minuten auf 115V erhöht.

3.2.5.5 Western Blot

Der Blotting-Vorgang folgte dem Prinzip des Nass-Blottings. In einer mit Transferpuffer gefüllten Blottingkammer wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine bei 4°C auf eine Nitrocellulosemembran bei 90 V und 3 A für 90 Minuten übertragen. Die erfolgreiche Proteinübertragung wurde durch eine Färbung mit Ponceaurot überprüft. Nach Markierung der Leiter konnte die Membran mit Aqua dest. entfärbt werden. Das Aufbringen der

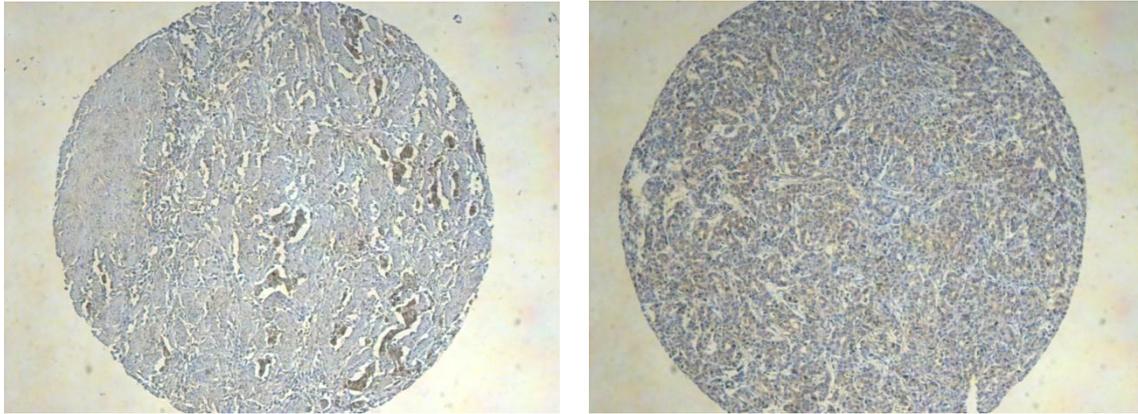
Blockadelösung erfolgte nach zehn minütiger Waschung mit 1x TBST. Die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. Anschließend wurde der Primärantikörper aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem fünfminütigem Waschen mit TBST wurde die Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper, versetzt mit 1,3 µl Precision Protein Streptacin HRP conjugate, inkubiert. Die Detektion erfolgte nach erneuter Waschung von fünf und zehn Minuten im VersaDoc. Zur digitalen Aufnahme wurde die Membran in den VersaDoc übertragen und unter Lichtausschluss bis zum Auftreten einer sichtbaren Fluoreszenz mit ECL-Lösung inkubiert. Die Membran wurde danach zwei Mal für fünf Minuten gewaschen und mit dem Primärantikörper des Housekeeping-Proteins für 60 Minuten inkubiert. Die Inkubation für weitere 60 Minuten mit dem Sekundärantikörper in Lösung mit 1,3 µl Precision Protein Streptacin HRP conjugate erfolgte nach zweimaliger Waschung für fünf Minuten. Anschließend erfolgte die analoge Detektion im VersaDoc.

3.2.6 HRP-Immunhistochemie

Die HRP (Horseradish-Peroxidase) - Immunhistochemie wurde genutzt, um die Expression bestimmter IAPs im Ösophaguskarzinom quantifizieren zu können.

3.2.6.1 Tissue Microarrays (TMA)

Gefärbt wurden in der HRP-Immunhistochemie Tissue Microarrays, die Proben von insgesamt 90 Patienten mit Adenokarzinomen und 120 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus enthielten. Pro Patient standen je zwei Stenzen aus der Tumordinvasionsfront und dem Tumorzentrum, sowie eine Stanze aus dem Normalgewebe und soweit vorhanden eine Stanze aus einer Lymphknotenmetastase zur Verfügung. Auf Abb.5 sind zwei Beispiele dargestellt für Stenzen mit einer Survivin- bzw. XIAP-Färbung. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit Hilfe der Leica Application Suite.



5a) Survivin

5b) XIAP

Abb. 5: Übersichtsabbildung einer TMA-Stanze in 10x10facher Vergrößerung. a) Stanze einer Probe aus Tumorgewebe eines EAC, gefärbt mit Survivin-Antikörper. b) Stanze einer Probe aus Tumorgewebe des gastroösophagealen Übergangs, gefärbt mit XIAP-Antikörper.

3.2.6.2 Durchführung der HRP-Immunhistochemie

Die gewählten Präparate wurden zur Vorbereitung auf die Färbung zweimal für je zehn Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe bestehend aus 99,5%-, 96%-, 80%- und 70%- Ethanollösung für je zweimal zwei Minuten geführt. Zum Abschluss wurden die Proben für einen Zeitraum von mindestens fünf Minuten in Aqua dest. inkubiert. Bei der anschließenden Demaskierung wurden die Schnitte vollständig in Retrieval Solution getaucht für 30 Minuten bei maximaler Wattzahl in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlung bei Raumtemperatur erfolgte ein fünfminütiger Waschvorgang mit PBS + 0,1% Tween 20. Die Objektträger wurden nun abgetrocknet und die Schnitte mit einem Super Pap Pen Mini zur Begrenzung umrandet. Um unspezifische Reaktionen bei der Färbung zu vermeiden, wurde die endogene Peroxidase durch Auftragen von 150 µl 3,0% H₂O₂-PBS pro Schnitt inhibiert. Es folgte ein dreimal zweiminütiger Waschvorgang mit PBS + 0,1% Tween 20 nach Ablauf der zehn Minuten Inkubationszeit. Im Folgenden wurden die Schnitte 10 Minuten in der Blockierlösung aus dem ZytoChem-Plus HRP-Kit inkubiert. Nach zweiminütigem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Es schloss sich ein dreimaliger Waschvorgang für zwei Minuten an, der von der Inkubation mit dem Sekundärantikörper (biotinylated antibody) für 15 Minuten gefolgt wurde. Nach Wiederholung des vorangegangenen Waschvorgangs wurde das Enzymkonjugat aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der anschließende Waschvorgang erfolgte für fünf Minuten in destilliertem Wasser. Zur Visualisierung wurden pro Schnitt zwei Tropfen DAB-Substrat aufgetragen und für fünf bis zehn Minuten bis zur

Entwicklung der gewünschten Farbintensität im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ebenfalls ein fünfminütiger Waschvorgang in destilliertem Wasser. Die Kernfärbung erfolgte durch Eintauchen der Schnitte in Mayers Hämalaun für 15 Sekunden mit anschließender Wässerung für fünf Minuten. Die Färbung wurde durch die Behandlung in der aufsteigenden Alkoholreihe in Konzentrationen von 70%-, 80%- und 90%-Ethanol für jeweils eine Minute beendet. Zum Abschluss erfolgte die Inkubation der Schnitte für mindestens zwei Minuten in Xylol. Anschließend konnten die Schnitte mit Entellan eingedeckelt werden.

3.2.6.3 Auswertung der HRP-Immunhistochemie

Die Auswertung der HRP-Immunhistochemie erfolgte nach einer leicht modifizierten Version des Immunreaktiven Score (IRS) nach Remmle und Stegner [107]. Danach wurden als Faktoren die Farbintensität (staining intensity: SI) und der Prozentsatz an positivem Zytoplasma und positiver Zellkerne herangezogen. Es war zu beachten, dass der Prozentsatz an Zellkernen nur bei Survivin berücksichtigt und bewertet werden konnte, da XIAP keine Kernfärbung zeigt. Eine schematische Darstellung der Bewertung kann Tabelle 8 entnommen werden.

Tabelle 8: Auswertung der HRP-Immunhistochemie durch Erstellung eines IRS.

Farbintensität	Keine Farbreaktion (0+)	Schwache Farbreaktion (1+)	Mäßige Farbreaktion (2+)	Starke Farbreaktion (3+)
Prozentsatz positiver Färbung				
Keine Färbung	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
< 10% pos. Färbung	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
10 – 50% pos. Färbung	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
51 – 80% Pos. Färbung	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
> 80% Pos. Färbung	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

3.2.7 Statistische Datenanalyse

Um die Expressionsunterschiede mittels IR-Score zwischen Ösophaguskarzinomen und Normalgewebe zu analysieren wurde der Man-Whitney-U-Test verwendet. Ebenfalls wurde der Man-Whitney-U-Test angewendet um einen statistischen Zusammenhang zwischen klinisch-pathologischen Parametern und der XIAP- bzw. Survivin-Expression zu untersuchen. Die Korrelation zwischen Survivin- und XIAP-Expression wurde anhand des Spearman's

Correlation Coefficient bestimmt. Für alle Tests war ein p-Wert von <0.05 als Signifikanzniveau gesetzt.

Für weitergehende Analysen wurden die IRS-Werte kategorisiert in zwei Gruppen: eine hohe ($IRS > 2$) und eine niedrige ($IRS \leq 2$) Survivin- bzw. XIAP-Expression. Der Cutoff-Wert orientiert sich dabei an dem Median für XIAP und Survivin aller erhobenen Daten in den untersuchten Geweben. Zur Analyse kategorialer Daten wurde der Chi-Square-Test verwendet. Die Outcome-Analysen orientierten sich am Gesamtüberleben, welches definiert wurde als Periode vom Zeitpunkt der Operation bis zum letzten Tag des Follow-Up bzw. Todeszeitpunkt. Ausgeschlossen wurden Patienten mit einem Überleben geringer als 30 Tage postoperativ. Zur statistischen Analyse wurden Kaplan-Meier-Kurven mit Hilfe des log-rank (Mantel Cox) – Tests erstellt. Hazard Ratios (HR) mit einem Konfidenzintervall von 95% wurden errechnet. Die multivariate Überlebensanalyse schloss alle untersuchten Variablen ein und wurde mittels logistischer Regression erstellt.

4. Ergebnisse

4.1 Patientencharakteristika

Nach Anwendung der Selektionskriterien wurden 90 EAC-Patienten und 120 ESCC-Patienten in die Auswertung eingeschlossen. Nach der immunhistochemischen Färbung mussten 10 EAC-Patienten und 6 ESCC-Patienten aufgrund von nicht ausreichend verwertbarem Material ausgeschlossen werden. Die Verteilung klinisch-pathologischer Parameter unter den final eingeschlossenen Patienten ist in Tabelle 9 dargestellt. Das mittlere Alter der EAC-Patienten zum Operationszeitpunkt betrug 66 Jahre (36-82) und 58 Jahre (37-87) bei ESCC-Patienten. Insgesamt wurden davon 67 EAC-Patienten und 108 ESCC-Patienten in die Überlebensanalyse eingeschlossen.

Tab. 9: TMA – Charakteristika.

	Adenokarzinome des Ösophagus (n = 80)		Plattenepithelkarzinome des Ösophagus (n=114)	
Alter				
Median		66		59
Range		36-82		37-83
Geschlecht	n	%	n	%
männlich	62	77,5	84	73,7
weiblich	18	22,5	30	26,3
Tumorstadium				
T1/T2	44	55,0	39	34,2
T3/4	33	41,3	75	65,8
fehlend	3	3,8	0	0
Lymphknoten				
N0	26	32,5	39	34,2
N1+	51	63,8	75	65,8
fehlend	3	3,8	0	
Metastasen				
M0	71	88,8	112	98,2
M1	6	7,5	2	1,8
fehlend	3	3,8	0	
Grading				
G1/G2	21	26,3	66	57,9
G3/4	53	66,3	48	42,1
fehlend	6	7,5	0	0
Resektionsstatus				
R0	75	93,8	114	100
R1	2	2,5	0	0
fehlend	3	3,8	0	0

4.2 Co-Expression von Survivin und XIAP im Ösophaguskarzinom

Die HRP-Immunhistochemie wurde als Methode zur Expressionsanalyse von XIAP und Survivin gewählt. Die Auswertung erfolgte nach histologischen Typen, wobei Adenokarzinome (inkl. Adenokarzinome des Ösophagus und des gastro-ösophagealen Übergangs) und Plattenepithel-Karzinome getrennt ausgewertet wurden. Ein p-Wert $< 0,05$ galt dabei als signifikanter Unterschied.

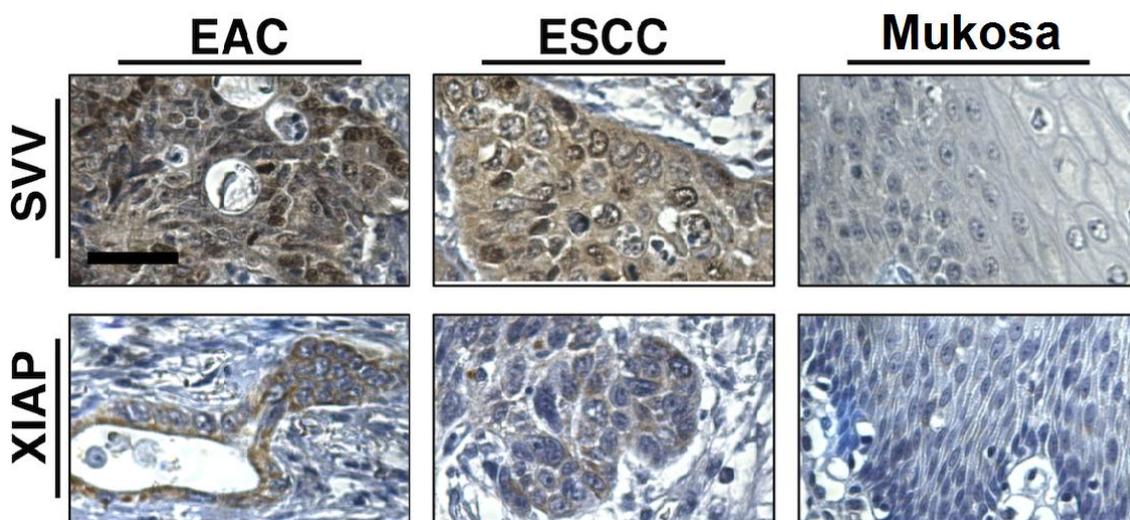


Abb. 6: Repräsentative Bilder der Immunhistochemie. Survivin (SVV) - und XIAP -Färbungen im Vergleich bei ösophagealem Adenokarzinom (EAC), Plattenepithelkarzinom (ESCC) und normaler Mukosa aus Tumorumgebung. Die Bilder wurden in 400-facher Vergrößerung aufgenommen, der eingetragene Maßstab beträgt 25 μm . Abbildung aus Dizdar et al. [139].

4.2.1 Expressionsanalyse in Tumor- und Normalgewebe

Die Immunhistochemie zeigte deutliche Färbung von Kernen und Zytoplasma für Survivin, für XIAP dagegen nur im Zytoplasma (Abb. 6). Im Vergleich zum angrenzenden Normalgewebe ließen sich signifikant höhere Expressionen von Survivin und XIAP sowohl im EAC, als auch im ESCC nachweisen ($p < 0,001$) (Abb. 5 B). Zusätzlich fiel auf, dass die nukleäre Survivin- und XIAP- Expression im EAC signifikant höher war verglichen mit dem ESCC ($p < 0,001$) (Abb. 7). Nebenbefundlich zeigte sich eine positive Korrelation zwischen zytoplasmatischer SVV- und XIAP-Expression im EAC ($r_s = 0,442$, $p < 0,001$) (Abb. 8).

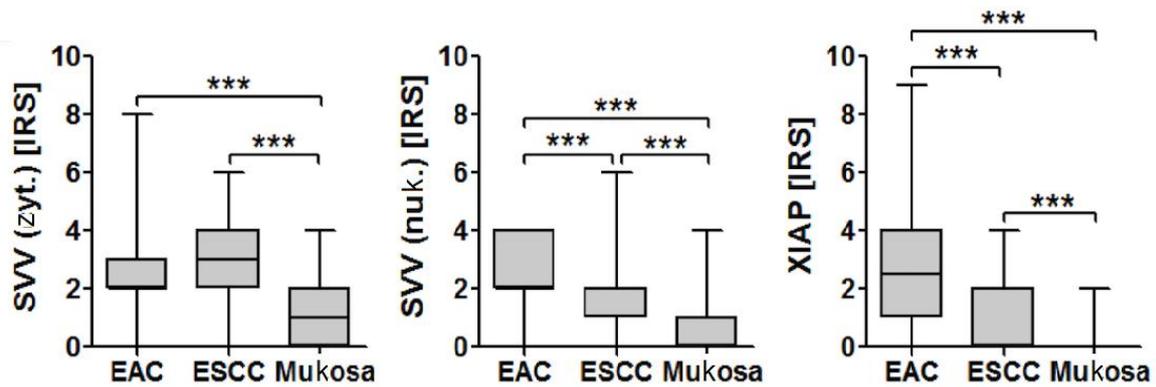


Abb. 7: Survivin und XIAP-Expression in Tumor- und Normalgewebe im Vergleich. SVV- und XIAP-Expression sind in den ösophagealen Karzinomproben im Vergleich zum Normalgewebe signifikant erhöht. Nukleäre SVV- und XIAP-Expression sind höher im EAC im Vergleich zum ESCC. Die Daten wurden mittels zweiseitigem Mann-Whitney-U-Test erhoben (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Abbildung aus Dizdar et al. [139].

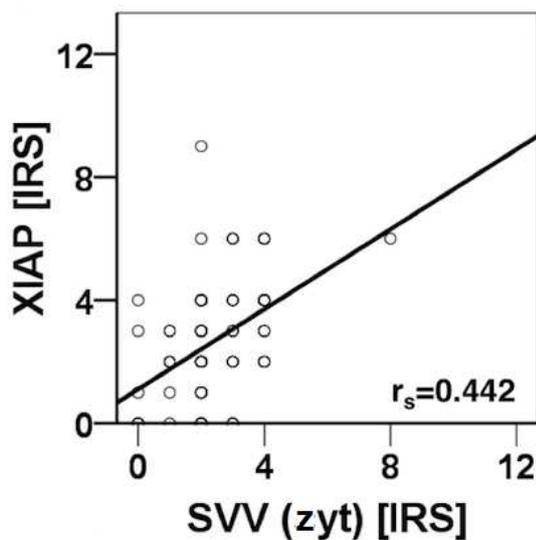


Abb. 8: Positive Korrelation zwischen XIAP- und zytoplasmatischer SVV-Expression in entsprechenden EAC-Proben. ($r_s = 0,442$, $p < 0,001$) Abbildung aus Dizdar et al. [139].

4.2.2 Korrelation zwischen Survivin-/XIAP-Expression und klinisch pathologischen Parametern

Um die Survivin- bzw. XIAP-Expression mit den klinisch pathologischen Parametern zu korrelieren, wurden zunächst die IR-Scores zwischen den einzelnen Kategorien jedes Parameters verglichen (Abb. 9). Hierbei zeigte sich, dass eine hohe XIAP-Expression in ESCC positiv mit dem weiblichen Geschlecht ($p < 0,01$) und einem fortgeschrittenen Tumorstadium (T3/4) ($p < 0,05$) korreliert. Eine hohe nukleäre Survivin-Expression korrelierte dagegen mit schlechter Tumordifferenzierung (G3) ($p < 0,01$). Im Gegensatz dazu brachte die Korrelation zwischen Survivin und XIAP Expression in EAC keine Ergebnisse von Signifikanz.

Im nächsten Schritt wurden die IRS-Werte in zwei Gruppen geteilt: Alle Patienten mit einem zugehörigen IRS-Wert ≤ 2 fallen dabei in die Gruppe mit niedriger Survivin- bzw. XIAP-Expression, alle Patienten mit einem zugehörigen IRS-Wert > 2 in die Gruppe mit hoher Survivin- bzw. XIAP-Expression. Der Cut off- IRS-Wert von 2 wurde gewählt, da dieser den Mittelwert aller erhobener IRS-Werte darstellt. Die Korrelation von SVV- und XIAP-Expression im EAC mit klinisch-pathologischen Parametern ergab keine signifikanten Ergebnisse (s. Tab. 10). In der Auswertung der Plattenepithelkarzinome des Ösophagus (s. Tab. 11) zeigt sich dagegen eine signifikante Korrelation zwischen hoher nukleärer Survivin-Expression und schlechter Tumordifferenzierung (G3) ($p = 0,012$). Weiterhin ist eine hohe XIAP-Expression häufiger bei weiblichen Patienten nachzuweisen ($p = 0,015$).

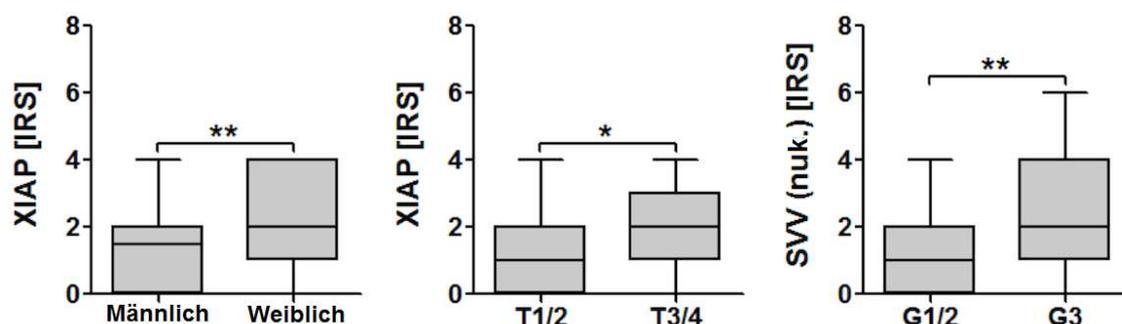


Abb. 9: IAP-Expressionslevel und ihre Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern. Die Boxplots zeigen den medianen IRS mit oberen und unteren Quartilen, sowie minimalen und maximalen IRS bezogen auf den jeweiligen Parameter. (Geschlecht: Median IRS weiblich = 2; Median IRS männlich = 1,5; $p = 0,003$; Tumorstadium: Median IRS T1/2 = 1; Median IRS T3/4 = 2; $p = 0,003$; Grading: Median G1/2 = 1, Median G3 = 2; $p = 0,005$). Die Daten wurden mittels zweiseitigem Mann-Whitney-U-Test erhoben (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Abbildung aus Dizdar et al. [139].

Tabelle 10: Korrelation zwischen Survivin-/XIAP-Expression und klinisch pathologischen Parametern von Adenokarzinomen des Ösophagus und ösophago-gastralen Übergangs. Berechnung der p-Werte erfolgte mittels Fisher's exact Test. Tabelle angepasst nach Dizdar et al. [139].

	Nukleäres Survivin			Zytoplasmatisches Survivin			XIAP		
	niedrig (n=51)	hoch (n=29)	p- Wert	niedrig (n=49)	hoch (n=31)	p- Wert	niedrig (n=40)	hoch (n=40)	p- Wert
Alter	n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
≤ Median	28(71,8)	11(28,2)		21(53,8)	18(46,2)		22(56,4)	17(43,6)	
> Median	23(56,1)	18(43,1)	0,144	28(68,3)	13(31,7)	0,185	18(43,9)	23(56,1)	0,263
Geschlecht									
Männlich	42(67,7)	20(32,3)		35(56,5)	27(43,5)		30(48,4)	32(51,6)	
Weiblich	9(50,0)	9(50,0)	0,168	14(77,8)	4(22,2)	0,102	10(55,6)	8(44,4)	0,592
Tumorstadium									
T1 / T2	27(61,4)	17(38,6)		24(54,5)	20(45,5)		24(54,5)	20(45,5)	
T3 / T4	21(63,6)	12(36,4)	0,839	23(69,7)	10(30,3)	0,177	13(39,4)	20(60,6)	0,188
Lymphknoten									
Negativ, N0	17(65,4)	9(34,6)		15(57,7)	11(42,3)		11(42,3)	15(57,7)	
Positiv, N+	31(60,8)	20(39,2)	0,694	32(62,7)	19(37,3)	0,677	26(51,0)	25(49,0)	0,471
Metastasen									
M0	45(63,4)	26(36,6)		43(60,6)	28(39,4)		34(47,9)	37(52,1)	
M1	3(50,0)	3(50,0)	0,516	4(66,7)	2(33,3)	0,768	3(50,0)	3(50,0)	0,921
Grading									
G1/G2	10(47,6)	11(52,4)		13(61,9)	8(38,1)		7(33,3)	14(66,7)	
G3/G4	36(67,9)	17(32,1)	0,104	32(60,4)	21(39,6)	0,903	28(52,8)	25(47,2)	0,130
Resektionsgrenzen									
Negativ, R0	47(62,7)	28(37,7)		46(61,3)	29(38,7)		36(48,0)	39(52,0)	
Positiv, R1	1(50,0)	1(50,0)	0,715	1(50,0)	1(50,0)	0,746	1(50,0)	1(50,0)	0,955

Tabelle 11: Korrelation zwischen Survivin-/XIAP-Expression und klinisch pathologischen Parametern von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus. Berechnung der p-Werte erfolgte mittels Fisher's exact Test. Tabelle angepasst nach Dizdar et al. [139].

	Nukleäres Survivin		p-Wert	Zytoplasmatisches Survivin		p-Wert	XIAP		niedrig (n=51)
	niedrig (n=89) n (%)	hoch (n=25) n (%)		niedrig (n=51) n (%)	hoch (n=63) n (%)		niedrig (n=40) n (%)	n (%)	
Alter									
≤ Median	42(73,7)	15(26,3)		23(40,4)	34(59,6)		48(84,2)	9(15,8)	
> Median	47(82,5)	10(17,5)	0,258	28(49,1)	29(50,9)	0,346	42(73,7)	15(26,3)	0,168
Geschlecht									
Männlich	64(76,2)	20(23,8)		36(42,9)	48(57,1)		71(84,5)	13(15,5)	
Weiblich	25(83,3)	5(16,7)	0,417	15(50,0)	15(50,0)	0,499	19(63,3)	11(36,7)	0,015
Tumorstadium									
T1 / T2	28(71,8)	11(28,2)		18(46,2)	21(53,8)		34(87,2)	5(12,8)	
T3 / T4	61(81,3)	14(18,7)	0,243	33(44,0)	42(56,0)	0,826	56(74,7)	19(25,3)	0,120
Lymphknoten									
Negativ, N0	32(82,1)	7(17,9)		18(46,2)	21(53,8)		34(87,2)	5(12,8)	
Positiv, N+	57(76,0)	18(24,0)	0,459	33(44,0)	42(56,0)	0,826	56(74,7)	19(25,3)	0,120
Metastasen									
M0	87(77,7)	25(22,3)		50(44,6)	62(55,4)		89(79,5)	23(20,5)	
M1	2(100,0)	0(0,0)	0,450	1(50,0)	1(50,0)	0,880	1(50,0)	1(50,0)	0,311
Grading									
G1/G2	57(86,4)	9(13,6)		32(48,5)	34(51,5)		54(81,8)	12(18,2)	
G3/G4	32(66,7)	16(33,3)	0,012	19(39,6)	29(60,4)	0,345	36(75,0)	12(25,0)	0,378
Resektionsgrenzen									
Negativ, R0	89(78,1)	25(21,9)		51(44,7)	63(55,3)		90(78,9)	24(21,1)	
Positiv, R1	0(0,0)	0(0,0)		0(0,0)	0(0,0)		0(0,0)	0(0,0)	

4.2.3 Prädiktive Faktoren in der Überlebensanalyse

Um *Outcome*-relevante Faktoren im Ösophaguskarzinom zu identifizieren, wurden eine univariate und anschließend eine multivariate Überlebensanalyse durchgeführt. Nach dem Kaplan-Meier-Verfahren wurden die Überlebensraten bestimmt und graphisch ausgewertet. Um die Überlebenszeiten statistisch miteinander zu vergleichen, wurde der Log-Rank-Test angewendet. Über die Berechnung der Cox-Regression konnte auch die Hazard Ratio mit einem Konfidenzintervall (CI) von 95% bestimmt werden. Für die multivariate Analyse wurden alle Variablen in eine logistische Regressions-Analyse eingeschlossen.

In die Überlebensanalyse wurden nur Patienten eingeschlossen, bei denen eine komplette Tumorentfernung (R0) möglich war und die postoperativ mindestens 30 Tage überlebt haben. Somit wurden die Daten von 76 EAC- und 108 ESCC-Patienten bewertet. Das mittlere Alter dieser Patienten bei Operation betrug 66 Jahre (Range 26-82) bei EAC-Patienten bzw. 58 Jahre (Range 37-83) bei ESCC-Patienten. Die retrospektive Follow-Up-Zeit betrug im Mittel 38 Monate (EAC) und 22,8 Monate (ESCC) bei einem identischem Range von 1-120 Monaten. Während dieser Zeit starben 47 EAC-Patienten und 89 ESCC-Patienten. Somit ergibt sich eine mittlere Gesamtüberlebenszeit von 49,3 Monaten (95% CI: 38,4-60,2 Monate) für EAC-Patienten und von 28,3 Monaten für ESCC Patienten (95% CI= 21,8-34,8 Monate).

In der univariaten Analyse (Tab. 12) zeigten sich bei den Adenokarzinomen der Lymphknotenstatus ($p = 0,018$) und die Metastasierung ($p < 0,001$) als negativ prädiktive Faktoren, jedoch hatten Survivin- und XIAP-Expression keinen Einfluss auf die Überlebenszeit. Bei den Plattenepithelkarzinomen dagegen war eine hohe XIAP-Expression mit einem schlechten Überleben assoziiert ($p = 0,019$) (Abb. 10). Als unabhängige negativ prädiktive Faktoren konnten anschließend die Metastasierung im EAC ($p = 0,001$) und die hohe XIAP-Expression im ESCC ($p = 0,002$) bestätigt werden (Tab. 13).

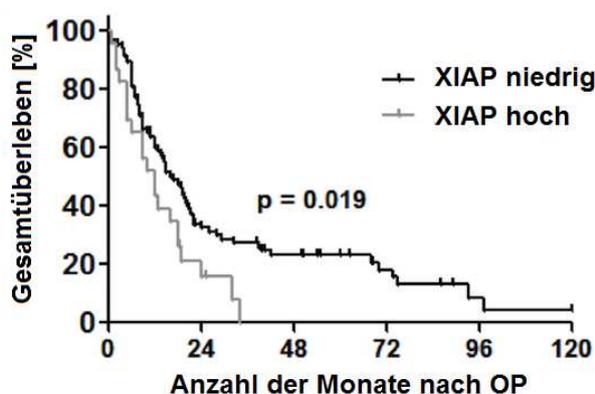


Abb. 10: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der prognostischen Wertigkeit der XIAP-Expression in ESCC. Eine hohe XIAP-Expression ist mit einem signifikante schlechteren Überleben assoziiert ($p=0,019$). Abbildung aus Dizdar et al. [139].

Tabelle 12: Univariate Analyse des Gesamtüberlebens von Ösophaguskarzinompatienten. Nach Dizdar et al. [139].

Variable	Adenokarzinome			Plattenepithelkarzinome		
	HR	95% CI	p-Wert	HR	95% CI	p-Wert
Alter	1.369	0.756 - 2.478	0.279	1.092	0.713 - 1.671	0.683
Geschlecht	0.901	0.421 - 1.930	0.781	1.328	0.819 - 2.154	0.243
T 1/2 vs. T 3/4	1.339	0.748 - 2.399	0.306	1.491	0.957 - 2.323	0.072
N0 vs. N+	2.173	1.097 - 4.305	0.018	1.348	0.865 - 2.102	0.181
M0 vs. M+	12.91	2.571 - 64.82	<0.001	3.445	0.833 - 14.240	0.065
G 1/2 vs. G 3/4	1.582	0.759 - 3.297	0.199	1.285	0.843 - 1.959	0.237
XIAP hoch vs. niedrig	0.931	0.524 - 1.653	0.798	1.798	1.087 - 2.973	0.019
SVV(zyt.) hoch vs. niedrig	1.222	0.687 - 2.175	0.478	0.870	0.571 - 1.326	0.513
SVV(nukl.) hoch vs. niedrig	0.841	0.460 - 1.539	0.559	1.066	0.651 - 1.744	0.797

Tabelle 13: Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens von Ösophaguskarzinompatienten. Nach Dizdar et al. [139].

Variable	Adenokarzinome			Plattenepithelkarzinome		
	HR	95% CI	p-Wert	HR	95% CI	p-Wert
M0 vs. M+	18.264	3.290 – 101.4	0.001	/	/	/
XIAP hoch vs. niedrig	/	/	/	1.798	1.087 – 2.973	0.022

4.2 Survivin und XIAP als Zielstruktur von Inhibitoren

4.2.1 Grundexpression der IAPs in Ösophaguskarzinom-Zelllinien

Um die Grundexpression der IAPs Survivin, XIAP, CIAP 1 und CIAP 2 auf Proteinebene darzustellen, wurde jeweils ein Western Blot mit Protein aus allen Zelllinien ohne vorherige Behandlung durchgeführt.

Für Survivin zeigt sich in allen Zelllinien mit Ausnahme von OE 19 eine starke Expression. XIAP und CIAP 1 sind in allen Zelllinien gleichermaßen exprimiert. CIAP 2 dagegen ließ sich nur in K30 und OE33 gut detektieren (s. Abb.11).

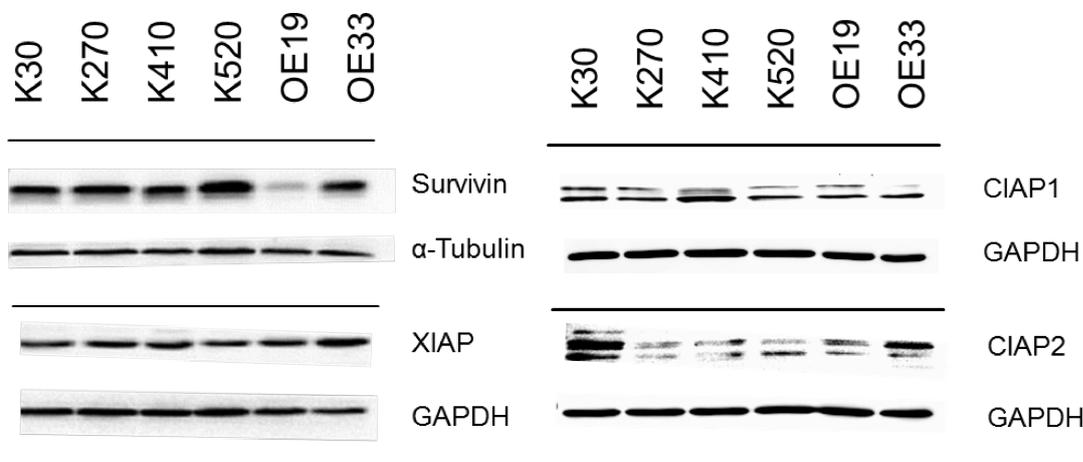


Abb. 11: Grundexpression auf Proteinebenen von Survivin, XIAP, CIAP1 und CIAP 2 in Plattenepithelkarzinom-Zelllinien (K30, K270, K410, K520) und Adenokarzinom-Zelllinien (OE 19, OE33) des Ösophagus. GAPDH und α -Tubulin wurden als *Loading-Kontrollen* verwendet.

4.2.2 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Lebendzellzahl

Um den Einfluss verschiedener molekularer Inhibitoren auf die Lebendzellzahl zu testen, wurden Proliferations-Assays mit allen Zelllinien durchgeführt.

Für den Survivin-Inhibitor YM155 zeigte sich im CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay nach 48 Stunden Inkubationszeit eine konzentrationsabhängige Wirkung in allen Zelllinien: Mit steigender Konzentration erniedrigte sich die Rate an überlebenden Zellen (s. Abb. 12). Eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) konnte bei allen Zelllinien in einem Bereich zwischen 10 nM und 100 nM festgelegt werden. Die Ergebnisse konnten durch einen Zellproliferations-ELISA bestätigt werden (s. Abb.13).

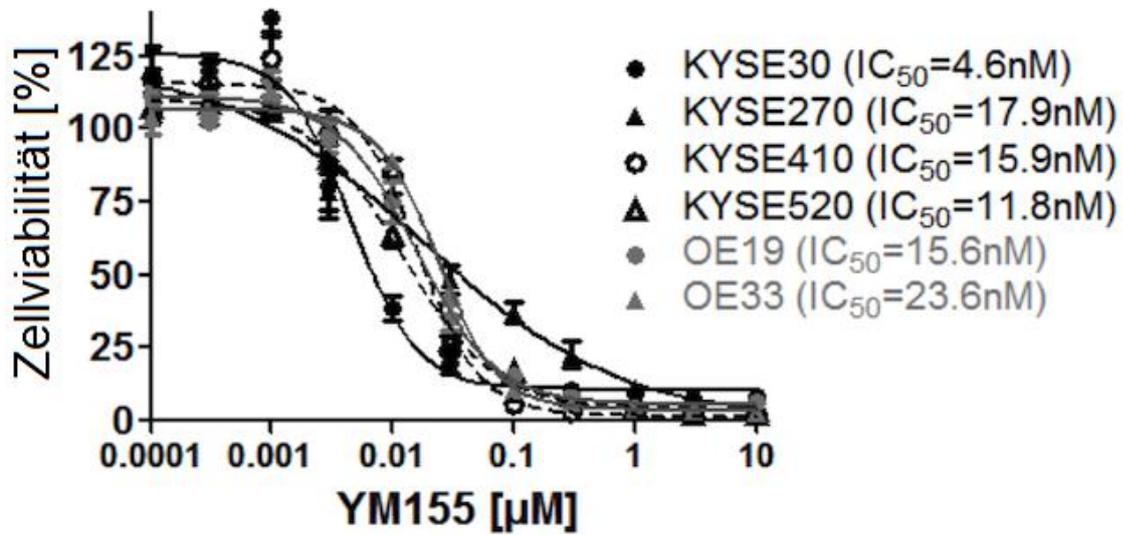


Abb. 12: Logarithmische Auswertung des CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay nach 48h Inkubation im YM155. YM155 induziert dosisabhängig eine Reduktion der Zellviabilität. Angegeben ist jeweils die mittlere inhibitorische Konzentration von YM155, bei der die halbmaximale Inhibition beobachtet wurde. Abbildung aus Dizdar et al. [139].

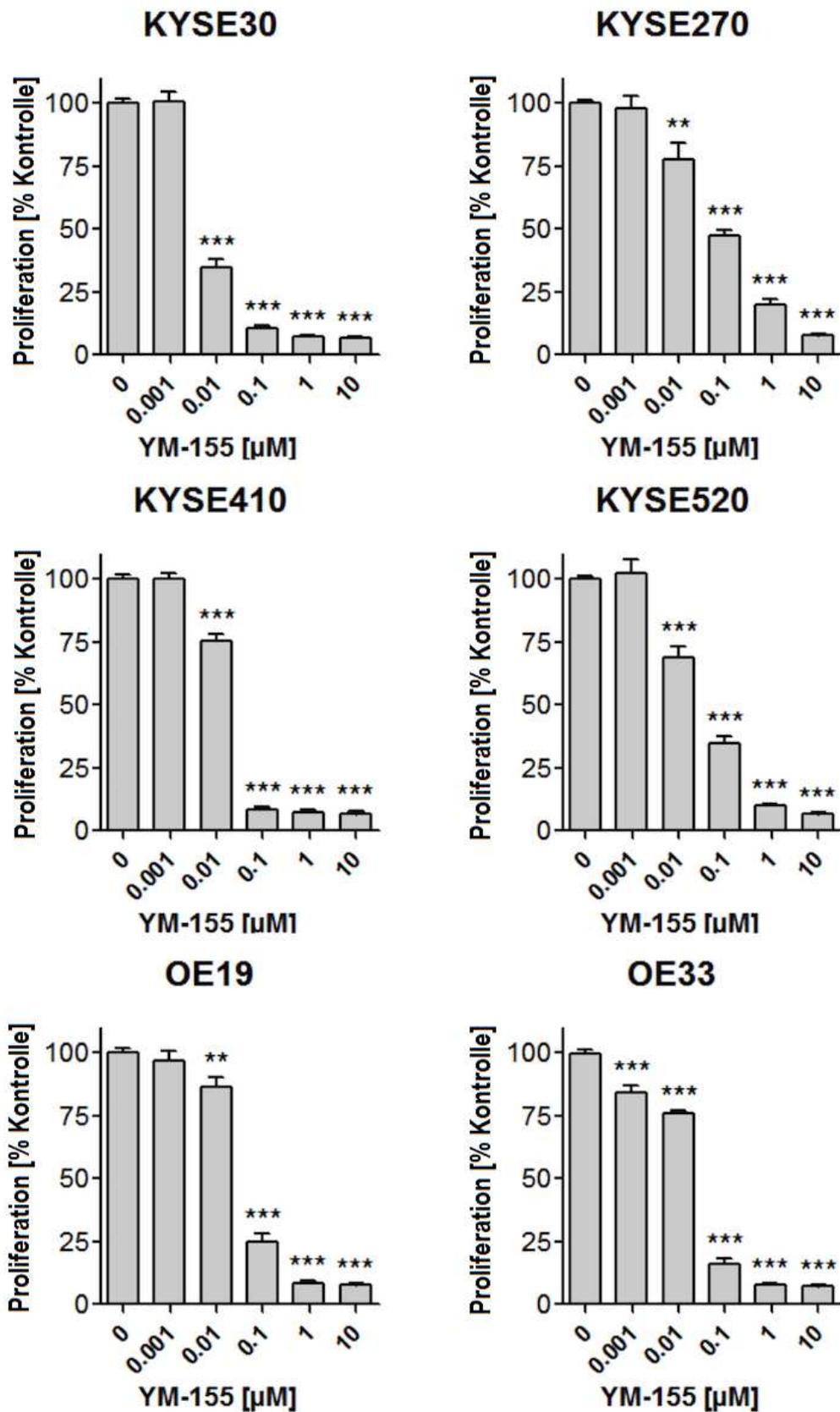


Abb. 13: Auswertung des Zellproliferations-ELISA nach 48h Inkubation mit YM155. YM155 reduziert signifikant die Zellproliferation in EAC- und ESCC-Zelllinien. DMSO wurde als Kontrolle verwendet. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-U-Test (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$). Abbildung aus Dizdar et al. [139].

Auch der Survivin-Inhibitor, M4N (Tetra-O-methyl Nordihydroguaiaretic Acid), wurde im Proliferations-Assay getestet. Es zeigte sich in allen Zelllinien außer OE19 ein inhibitorischer Effekt auf die Zellproliferation ab einer Konzentration von ca. 30 μM (s. Abb. 16). Allerdings sank die Lebendzellzahl auch bei einer sehr hohen Konzentration an M4N von 1 mM nur auf ca. 50% der Ausgangswerte.

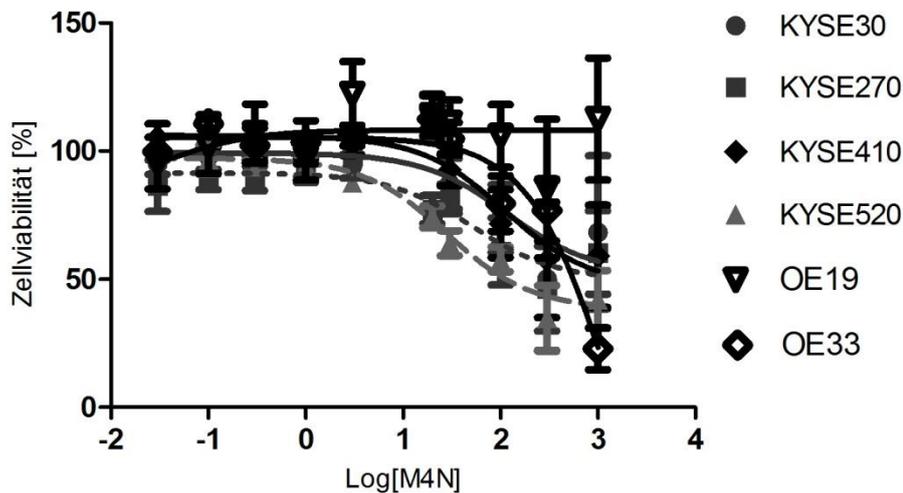


Abb. 16: Logarithmische Auswertung des CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay nach 48h Inkubation mit M4N. Ein inhibitorischer Effekt in den Zelllinien der Plattenepithelkarzinome zeigt sich ab einer M4N Konzentration von 30 μM . Die EAC-Zelllinie OE19 zeigt keine Reaktion auf M4N, bei OE33 dagegen sinkt die Zellzahl ab 30 μM fast auf 0% ab.

Im Proliferations-ELISA (s. Abb. 17) konnten genauere Werte erhoben werden: Die IC50-Werte im Plattenepithelkarzinom lagen dabei in einem Bereich zwischen 153,9 μM und 705,5 μM . Im Adenokarzinom betragen die IC50-Werte für OE19 68,9 μM und für OE33 476,2 μM .

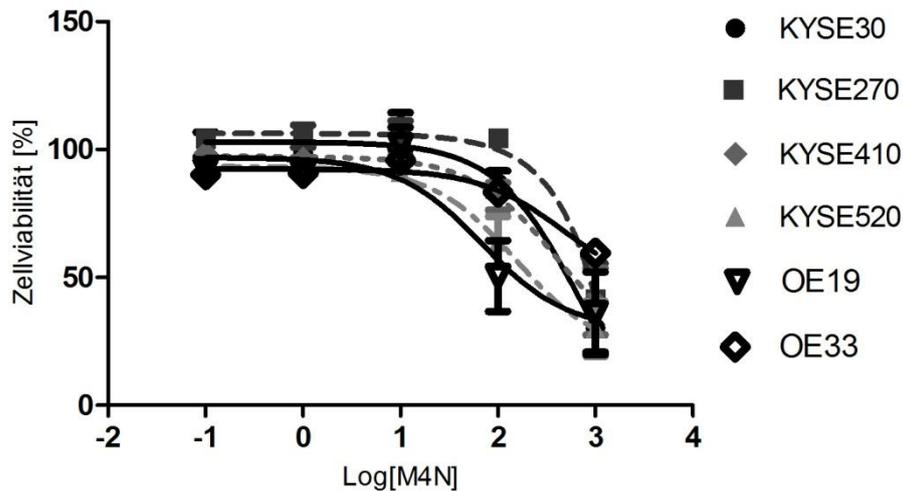


Abb. 17: Logarithmische Auswertung des Proliferations-ELISA nach 48h Inkubation mit M4N. Es bestätigt sich ein inhibitorischer Effekt von M4N in allen Zelllinien. Die IC₅₀-Werte schwanken jedoch stark in einem Bereich von 68,9 μ M bis 705,5 μ M. Die Zelllinie OE19 weist innerhalb der erhobenen Werte starke Schwankungen auf.

Bei Behandlung der Zelllinien mit den XIAP-Inhibitoren GDC-0152 und Birinapant zeigte sich kein konzentrationsabhängiger Effekt im CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (s. Abb.14).

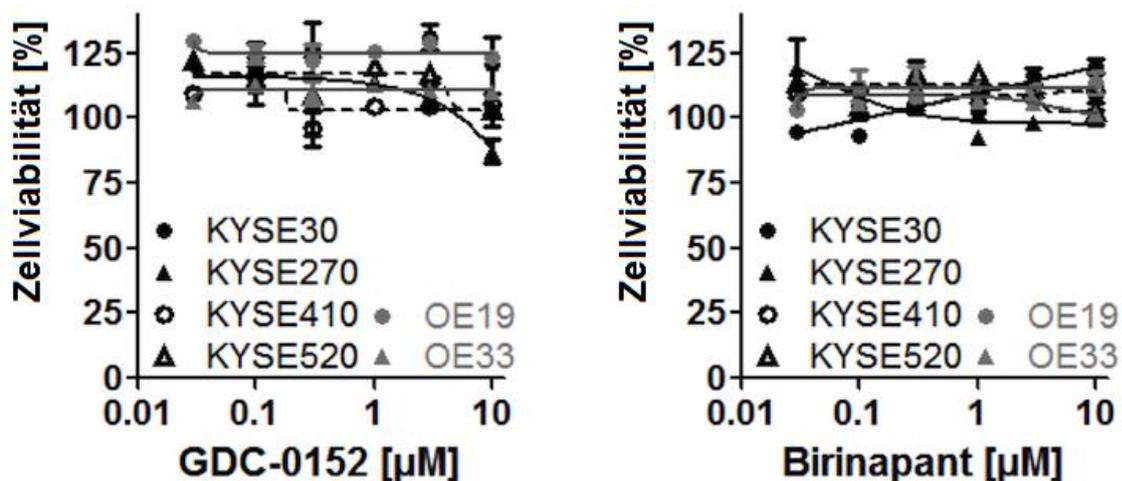


Abb. 14: Logarithmische Auswertung des CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay nach 48h Inkubation mit GDC und Birinapant. Die verwendeten Zelllinien wurden für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an GDC-0152 und Birinapant inkubiert. Es zeigte sich kein konzentrationsabhängiger Effekt in Bezug auf die Lebendzellzahl. Abbildung aus Dizdar et al. [139].

Auch das Smac-Mimetic AT406 zeigte keine konzentrationsabhängige Wirkung im CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (s. Abb.15).

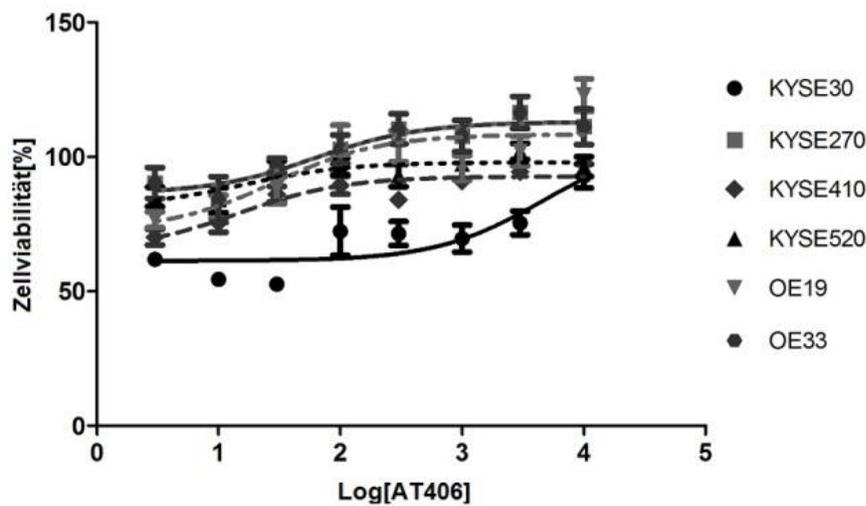


Abb. 15: Logarithmische Auswertung des CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay nach 48h Inkubation mit AT406. Die verwendeten Zelllinien wurden für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von AT406 inkubiert. Ein inhibitorischer Effekt auf die Lebendzellzahl konnte nicht beobachtet werden.

4.2.3 Der Einfluss von YM155 in Ösophagus-Zelllinien

Um den Einfluss von YM155 auf die Protein-Expression der verschiedenen IAPs zu untersuchen, wurden Western Blots mit Proteinen aus Ösophaguszelllinien durchgeführt, die vorher mit verschiedenen Konzentrationen an YM155 für 48 Stunden behandelt worden sind. Die gewählten Konzentrationen ergaben sich aus den IC50-Konzentrationen, die zuvor im CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay und Zellproliferations-ELISA erarbeitet wurden.

Für Survivin zeigte sich in allen Zelllinien eine Korrelation zwischen Survivin-Expression und YM155-Konzentration: Survivin wurde in mit YM155 behandelten Zellen stark vermindert exprimiert. In den Zelllinien KYSE270, KYSE410 und OE19 konnte darüber hinaus beobachtet werden, dass eine steigende YM155-Konzentration mit einer Abnahme der Survivinexpression einhergeht (Abb. 18). Bei der Detektion von XIAP zeigt sich erstaunlicher Weise eine Abnahme der Expression unter YM155 in den ESCC- Zelllinien KYSE270 und KYSE520.

Zum Nachweis von Apoptose im Zusammenhang mit YM155 wurde ein Western Blot mit dem Antikörper PARP (Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase) durchgeführt (s. Abb.18). PARP konnte dabei in allen Zelllinien nachgewiesen werden. Sein Spaltprodukt, cleaved – PARP,

zeigte sich nur in zuvor im YM155 behandelten Zellen. In den Zelllinien K410 und K520 zeigt sich dabei eine vermehrte Nachweißbarkeit des Spaltprodukts bei steigender YM155-Konzentration.

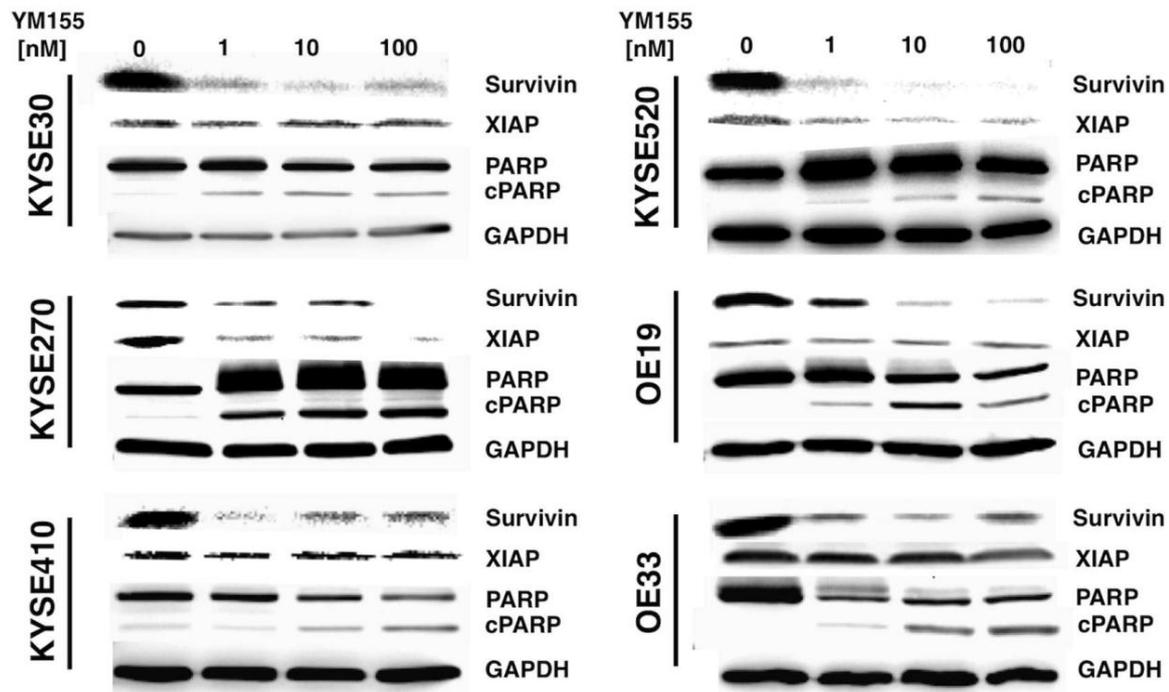


Abb. 18: Detektion von Survivin, XIAP und der PARP-Spaltprodukte in Ösophagus-Zelllinien nach 48 Stunden Inkubation mit YM155. PARP ist in allen Zelllinien unabhängig von der YM-Konzentration exprimiert. Das Spaltprodukt cleaved-PARP und Survivin sind nach Behandlung mit YM155 in allen Zelllinien reduziert. Weiterhin zeigt XIAP eine dosisabhängige Reduktion nach YM155-Behandlung in den Zelllinien KYSE 270 und KYSE520. GAPDH wurde als *Loading*-Kontrolle gewählt. Abbildung aus Dizdar et al. [139].

5. Diskussion

5.1 Die IAP-Familie im Ösophaguskarzinom

Die IAP-Familie spielt eine entscheidende Rolle in der Kontrolle des apoptotischen Zelltodes [108]. Es ist bekannt, dass in Tumoren die Regulation der Apoptose verändert ist und sich durch eine gesteigerte Anzahl überlebender Zellen kennzeichnet [48]. Daher hat man die Expression bestimmter IAP in verschiedenen Tumorgeweben untersucht, sie mit klinisch pathologischen Parametern korreliert und ihre prognostische Wertigkeit untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass IAPs in vielen Karzinomarten überexprimiert sind [65]. Über ihre genaue Rolle im Ösophaguskarzinom besteht allerdings noch Uneinigkeit. Daher wurde die Expression der zwei ausgewählten IAP-Mitglieder Survivin und XIAP im Ösophaguskarzinom untersucht.

5.1.1 Survivin als prognostischer Faktor

Survivin ist das wahrscheinlich am besten erforschte und prominenteste Mitglied der IAP-Familie. Es ist in vielen Tumoren überexprimiert und oftmals zeigt sich ein Zusammenhang zwischen Tumoreigenschaften, Prognose und Survivin-Expression [41]. Zu der Expression von Survivin im Ösophaguskarzinom gibt es bereits mehrere Arbeiten, die sich allerdings teilweise widersprechen und nur Teilaspekte abdecken. Die Expression von Survivin wird dabei in ESCC und EAC getrennt untersucht, sowie in Nukleus und Zytoplasma jeweils getrennt voneinander bewertet.

Im ösophagealen Plattenepithelkarzinom zeigen die vorliegenden Ergebnisse eine signifikant höhere Expression von Survivin im Nukleus und im Zytoplasma gegenüber dem Normalgewebe. Diese Beobachtung deckt sich zum einen mit den Ergebnissen von Kato et al. [109] auf mRNA - Ebene und Grabowski et al. [110], die ebenfalls die Immunhistochemie als Methode zur Quantifizierung gewählt haben. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Takeno et al. [111], die keinen signifikanten Unterschied zwischen der nukleären Survivinexpression im Tumor- und Normalgewebe feststellen konnten. Sie zeigten zum anderen jedoch, dass die zytoplasmatische Survivinexpression mit einer schlechteren Differenzierung ($p < 0,01$) und Tumorinvasion ($p < 0,01$) korreliert. Andere Immunhistochemische Untersuchungen sehen lediglich Korrelationen zwischen einem positiven Lymphknotenstatus und der nukleären Survivinexpression [112]. Die aktuelle Datenlage weist also darauf hin, dass Survivin im ösophagealen Plattenepithelkarzinom stark exprimiert ist. Auch in der Bewertung von Survivin als prognostischer Faktor gehen die Meinungen weit auseinander. Takeno et al. [111] sehen die zytoplasmatische Survivinexpression als prognostischen Faktor, der sowohl in der univariaten, als auch in der multivariaten Analyse die Überlebenszeit der Patienten

unabhängig von anderen Faktoren negativ beeinflusst. Gegensätzliche Daten erhoben Dabrowski et al. [113], sowie Grabowski et al. [110], die keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der zytoplasmatischen Survivinexpression und dem Überleben feststellen konnten. Die nukleäre Survivinexpression wird dagegen in mehreren Studien als signifikanter Faktor gesehen, der mit einer schlechten Prognose und reduziertem Überleben assoziiert ist [110, 112]. Zhu et al. [97] sieht Survivin sogar als einen wichtigeren prognostischen Faktor an als Metastasierung oder Tumorstatus. Die von uns erhobenen Daten zeigen allerdings weder für zytoplasmatische, noch für eine nukleäre Survivin-Expression prognostische Relevanz, was sich mit den Beobachtungen von Hui et al. [114] und Dabrowski et al. [113] deckt. Neben der Survivin-Expression stellten sich in einigen Studien auch der TNM-Status [110, 111] oder das UICC-Stadium [113] als prognostische Faktoren dar. Allerdings fällt der Vergleich der Überlebensanalysen schwer, da unterschiedliche Therapieschemata verwendet wurden. Intraoperative Vorgehensweise, neoadjuvante oder adjuvante Radio-, Chemo- oder Radiochemotherapie, sowie alternative Behandlungsmethoden beeinflussen die Überlebenszeit. Somit muss deutlich unterschieden werden unter welchen Umständen die Überlebensdaten der einzelnen Studien erhoben wurden und daraufhin die Survivin-Expression verglichen werden. Die Daten der vorliegenden Arbeit stammen von Patienten, die alle einer Ösophagektomie unterzogen wurden. Über weitere prä- oder postoperative Therapien sind allerdings keine Daten erfasst worden. Ein repräsentativer Vergleich mit den einzelnen Studien im Detail ist somit nur eingeschränkt möglich.

Die Studienlage zur Survivin-Expression im Adenokarzinom des Ösophagus ist bislang noch sehr eingeschränkt. Lediglich die Ergebnisse dreier Studien konnte zum Vergleich mit den von uns erhobenen Daten herangezogen werden. Zum einen hat Malhotra et al. [99] die Survivin Expression auf mRNA-Ebene analysiert und eine signifikante Erhöhung im Vergleich zum Normalgewebe festgestellt. Dieses Ergebnis wurde durch Vallböhmer et al. [115] mit Verwendung der gleichen Methode bestätigt. Durch Verwendung der IHC konnte bei unseren Ergebnissen nach zytoplasmatischer und nukleärer Survivin-Expression unterschieden werden, welche beide eine signifikante Erhöhung gegenüber dem Normalgewebe zeigten. In unserer univariaten Überlebensanalyse zeigten sich Metastasierung und Lymphknotenstatus als negativ prognostische Faktoren. In der multivariaten Analyse konnte die Metastasierung als unabhängiger Faktor bestätigt werden. Eine prognostische Bedeutung der Survivin-Expression konnte jedoch weder in unserer Studie, noch in anderen Veröffentlichungen nachgewiesen werden [99, 100, 115].

Vergleicht man nun abschließend die Survivin-Expression in ösophagealen Plattenepithel- und Adenokarzinomen, kann man in beiden histologischen Typen eine vermehrte Expression von Survivin im Tumorgewebe nachweisen. Dies bestätigt das spezifische Auftreten von Survivin in Karzinomen, während es in gesundem Gewebe kaum nachweisbar ist. Es

konnte sogar eine verstärkte Survivin-Expression entlang der Metaplasie-Dysplasie-Adenokarzinomsequenz des Ösophagus nachgewiesen werden [115]. Survivin ist also ein tumorspezifisches Protein und eignet sich somit als Zielstruktur in der Therapie des Ösophaguskarzinoms. Die unterschiedliche Bewertung der Survivin-Expression im Nukleus und Zytoplasma sollte dabei kritisch bewertet werden. Li et al. [116] legte dar, dass die nukleäre Survivin-Expression sich oft falsch positiv darstellt und dies einer der entscheidenden Fehlerquellen in der Auswertung der IHC darstellt. Um dieses Problem zu umgehen, könnten Western Blots aus nukleären und cytoplasmatischen Extrakten als Alternativmethode durchgeführt werden [116].

5.1.2 Unterschätzter Marker im Ösophaguskarzinom – XIAP

In seiner Funktion als einziger direkter Caspasen-Inhibitor in der IAP-Familie spielt XIAP eine große Rolle in der Regulation der Apoptose [76]. XIAP wurde in Zelllinien vieler Karzinome bereits nachgewiesen [117]. Ebenso wie für Survivin konnte für XIAP eine verstärkte Expression in verschiedenen Tumorgeweben gegenüber dem Normalgewebe nachgewiesen werden [118]. Darüber hinaus zeigte sich XIAP beispielsweise im klarzelligen Nierenzellkarzinom [118] und in der akuten myeloischen Leukämie [117] als unabhängiger prognostischer Marker in der Überlebensanalyse.

Im Ösophaguskarzinom ist die Expression von XIAP bisher lediglich für das Plattenepithelkarzinom untersucht worden. Zhang et al. [103] konnten für XIAP eine verstärkte Expression im Tumorgewebe des ESCC feststellen, was in unseren Ergebnissen bestätigt werden konnte. Zhou et al. [101] fanden darüber hinaus in ihrer immunhistochemischen Analyse von 78 Patientenproben einen signifikanten Zusammenhang zwischen erhöhter XIAP-Expression und pTNM-Stadien und der Tumordifferenzierung. In unserer Analyse der klinisch pathologischen Parameter konnte eine signifikante Korrelation der XIAP-Expression sowohl mit dem weiblichen Geschlecht, als auch mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium gefunden werden. Zhou et al. konnten zeigen, dass ein erhöhtes XIAP-Level im Tumorgewebe mit einer verkürzten Überlebenszeit korreliert ist [101]. Unsere Daten konnten diese prognostische Relevanz von XIAP bei ESCC-Patienten bestätigen.

Im Adenokarzinom des Ösophagus wurde die XIAP-Expression bisher noch nicht untersucht. Wir konnten auf immunhistochemischer Ebene zeigen, dass XIAP im Tumorgewebe signifikant stärker exprimiert ist als im Normalgewebe. Bei der Korrelation der XIAP-Expression bei EAC-Patienten mit klinisch-pathologischen Parametern zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge. Auch in der Überlebensanalyse zeigte sich für XIAP im EAC keine prognostische Wertigkeit. Wie bereits für das Plattenepithelkarzinom ausgeführt, sind auch bei der Analyse der Überlebensdaten des Adenokarzinoms keine weiteren Details

bezüglich einer adjuvanten Therapie miteinbezogen worden. Da bisher keine anderen Studien zur XIAP-Expression im Adenokarzinom des Ösophagus erschienen sind, bleibt abzuwarten, inwiefern unser Fazit im Vergleich zu zukünftigen Ergebnissen eingeordnet werden kann.

Darüber hinaus konnten wir in Proben der EAC-Patienten eine positive Korrelation der Expression von zytoplasmatischem Survivin und XIAP nachweisen, welche die wichtige Rolle beider IAPs in Bezug auf ihre intermolekulare Zusammenarbeit unterstreicht. Dohi et al. [92] beschrieben diesbezüglich bereits die Interaktion von Survivin und XIAP, die hauptsächlich in Mitochondrien und Zytoplasma stattfindet.

Insgesamt konnten wir bestätigen, dass XIAP auch im Ösophaguskarzinom eine tumorspezifische Expression zeigt und so die Beobachtungen von Nemoto et al. [119] durch signifikante Ergebnisse bestätigen. Obwohl die alleinige Wertigkeit von XIAP als prognostischer Faktor sowohl im Adenokarzinom aufgrund mangelnder Anzahl von Studien bisher nicht belegt ist, zeichnet sich ab, dass XIAP in Kombination mit Radio- bzw. Chemotherapie als Zielstruktur in der Krebstherapie des Ösophagus eine zunehmende Rolle spielen könnte [101, 103].

5.2 Die IAP-Familie in der zielgerichteten Therapie

5.2.1 XIAP: BIR-Domänen im Fokus von Inhibitoren

Die BIR-Domänen von XIAP haben unter anderem die Funktion der direkten Caspase-Inhibition inne [76, 77], sodass sich diese Strukturen ideal als Zielpunkte einer therapeutischen Hemmung zur Induktion von Apoptose eignen. Auf Proteinebene zeigte sich eine gleichmäßige Expression von XIAP in allen verwendeten Zelllinien, auch eine Expression von cIAP1 und cIAP2, die identische BIR-Domänen enthalten [41], konnte in einigen Zelllinien nachgewiesen werden. Auf dieser Grundlage haben wir uns entschieden, zwei verschiedene Compounds zu testen, deren Zielstrukturen die BIR-Domänen sind.

Bei den Inhibitoren der BIR-Domänen handelt es sich um sog. *Smac-Mimetics*, da sie die Funktion des Smac-Moleküls imitieren sollen [80]. Bei einem der beiden Substanzen handelt es sich um GDC-0152, welches spezifisch an die BIR3-Domäne von XIAP, cIAP1 und cIAP2 bindet [120]. Eine Behandlung von Zelllinien des Mammakarzinoms hatte eine Caspase 3- und Caspase 7-Aktivierung mit anschließendem Zelltod zur Folge [120]. Für das Ösophaguskarzinom konnten wir im Proliferationsassay allerdings keinen Effekt auf die Lebendzellzahl feststellen. Auch Birinapant, welches ebenfalls die BIR3-Domäne inhibiert und zusätzlich zu einer Autoubiquitination von cIAP1 führt [121, 122], konnte in den Ösophaguszelllinien keine Apoptose auslösen. Es wurde bereits gezeigt, dass Smac-Mimetics in

alleiniger Anwendung keine oder nur geringe Auswirkungen in ausgewählten Tumorzelllinien erzielen konnten [89, 123]. Jedoch konnte für das Ösophaguskarzinom durch Anwendung von Smac-Mimetics eine Sensitivierung von Tumorzellen gegenüber Radiotherapie [124] und Chemotherapie [125] nachgewiesen werden. Auch wenn XIAP-Antagonisten allein in unseren Versuchsreihen keinen direkten Effekt auf Ösophaguskarzinom-Zellreihen zeigten, ist die Anwendung in Kombinationstherapien mit Chemo- oder Radiotherapie weiter in klinischen Studien zu evaluieren.

5.2.2 Survivin als vielversprechende Zielstruktur

Von allen Mitgliedern der IAP-Familie gilt Survivin allgemein als das Mitglied mit den am besten erforschten und vielfältigsten Funktionen in der Regulation der Zellhomöostase. Durch seine starke Expression in vielen Tumorgeweben und der kaum nachweisbaren Expression in gesundem Gewebe [65] eignet sich Survivin als Zielstruktur von neuen Krebstherapien mit der Möglichkeit das Tumorgewebe spezifisch zu behandeln mit möglichst wenig Nebenwirkungen. In unserer immunhistochemischen Auswertung hat sich auch für das Ösophaguskarzinom eine verstärkte Expression von Survivin bestätigt. Auf Proteinebene konnte in allen verwendeten Ösophagus-Zelllinien mit einer deutlichen Survivinexpression nachgewiesen werden. Somit eigneten sich diese Zelllinien zur Austestung verschiedener Inhibitoren von Survivin.

Zum einen wurde der Einfluss von Tetra-O-methyl Nordihydroguaiaretic –Säure (M4N) auf die Zellproliferationsrate in Ösophaguszelllinien getestet. Es handelt sich dabei um einen Transkriptions-Repressor für Gene, die von dem Sp1-Transkriptionsfaktor abhängig sind, wie z.B. Survivin [87]. In einer Studie zu Glioblastomen zeigte sich M4N-abhängig eine erhöhte Zelltod-Rate und verminderte Zellproliferationsrate bei gleichzeitigem Rückgang der Survivin-Level [87]. In den Proliferationsassays zeigte sich auch in den Ösophaguskarzinom-Zelllinien ein inhibitorischer Einfluss von M4N auf die Zahl der lebenden Zellen. Im MTS-Assay konnten bei einer Konzentration von 1mM noch ein Zellüberleben von 50% festgestellt werden. Zur genaueren Quantifizierung wurden Proliferation-ELISA IC50-Werte bestimmt, die sich stark voneinander unterschieden und sich in einem Rahmen von ca. 70µM bis 700µM bewegten. Auch in anderen Studien wurden Streuungen der IC50-Werte innerhalb von Zelllinien der gleichen Krebserkrankung beobachtet: Die IC50-Werte für Glioblastome beispielsweise lagen im Rahmen von 87,5µM bis 171,39µM [87]. In Leukämie-Zelllinien zeigte sich bei einer M4N-Konzentration von 40µM eine eindeutige Auslösung des Zelltodes [126]. Im Vergleich zu anderen Krebs-Zelllinien zeigt M4N in Ösophagus-Zelllinien somit eingeschränkte Wirksamkeit: Die IC50-Werte liegen sehr viel höher und zeigen eine extreme Streuung innerhalb der verschiedenen Zelllinien. Obwohl M4N schon in präklinischen Studien bei guter

Verträglichkeit eine nachgewiesene Inhibition des Tumorwachstums hervorrufen konnte [127], ist dies für das Ösophaguskarzinom nur eingeschränkt zu erwarten. Die großen Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien und auch teilweise zwischen Werten innerhalb einer Zelllinie lassen keine eindeutigen Schlüsse bezüglich der Wirksamkeit von M4N im Ösophaguskarzinom zu. Daher wurde auch die genauere Funktion von M4N als möglicher Survivininhibitor im Ösophaguskarzinom nicht weiter untersucht.

5.2.3 YM155: Ein Survivininhibitor?

Auf der Suche nach einem potenten Survivininhibitor, der in der Lage ist Tumorwachstum zu bremsen und sogar zu einer Verkleinerung des Tumors führen kann, ist man auf das Molekül YM155 (Sepantronium Bromid) gestoßen. Initial wurde YM155 als Transkriptionsinhibitor von Survivin beschrieben, der die Verbindung zwischen dem Transkriptionsfaktor Sp1 und der Promotorregion von Survivin unterbricht [128, 129]. So zeigte sich unter anderem im Prostatakarzinom ein konzentrations- und zeitabhängiger inhibitorischer Effekt von YM155 auf die Survivin-Expression auf mRNA- und Proteinebene, während die Expression anderer Mitglieder der IAP-Familie, wie XIAP und cIAP1, unbeeinflusst blieben [128], sodass YM155 als spezifischer Survivin-Inhibitor gewertet wurde. Genauere Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von YM155 wurden seitdem durchgeführt mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Zum einen deklarieren Feng et al. [130], dass YM155 durch Runterregulation von Survivin Caspase-8-abhängigen Zelltod in Leukämie-Zelllinien auslösen kann. Zum anderen werden Wirkungsmechanismen diskutiert, die unabhängig von Survivin und der Caspase-abhängigen Apoptose sind. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass YM155 DNA-Schäden verursacht [131, 132]. Auch durch Autophagie induzierter Zelltod [133] oder eine PARP-abhängige Form des Zelltodes, Parthanatos [134], werden als Wirkungsmechanismus von YM155 diskutiert. Die Funktion von YM155 als spezifischer Survivininhibitor wird also mehr und mehr in Frage gestellt.

Wir haben die Wirkung von YM155 in ausgewählten Ösophaguskarzinom-Zelllinien getestet und in Zusammenhang mit der Survivin-Expression betrachtet. Qin et al. und Zhao et al. veröffentlichten bereits vielversprechende Ergebnisse zur Antitumor-Wirkung von YM155 in ESCC-Zelllinien, allerdings liegen zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Daten zu EAC-Zelllinien vor [134, 135]. Im Proliferationsassay konnte ein inhibitorischer Einfluss von YM155 auf die Lebendzellzahl festgestellt werden. Qin et al. [135] konnten in ihrer Studie in Zelllinien des ESCC ebenfalls IC₅₀-Werte von 12 bzw. 50nM nach 48 Stunden Inkubation mit YM155 erheben. Da die höheren IC₅₀-Werte in unseren ESCC und EAC Zelllinien durch den Proliferations-ELISA bestätigt werden konnten, ist davon auszugehen, dass die Ösophaguskarzinomzellen weniger sensibel auf YM155 reagieren als Leukämiezellen. Dennoch

zeigt sich in beiden Karzinomen, dass YM155 bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich den Zelltod maligner Zellen herbeiführen kann.

Um den Wirkungsmechanismus von YM155 zu untersuchen, stellten wir den Einfluss von YM155 auf die Expression zweier Mitglieder der IAP-Familie auf Proteinebene dar. Es zeigte sich eine Abnahme der Survivin-Expression bei steigenden YM155-Konzentrationen in allen Zelllinien unabhängig vom histologischen Subtypen. Die XIAP-Expression blieb dagegen unbeeinflusst. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen im Prostatakarzinom [128] und im nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom [136]. Zhao et al. [134] stellten fast gegensätzliche Ergebnisse für einige KYSE-Zelllinien des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus fest: KYSE410 zeigte auf Proteinebene keine Abnahme der Survivin-Expression nach YM155-Behandlung, dagegen wiesen alle Zelllinien stark reduzierte XIAP-Level unter YM155-Einfluss auf. Wie ein solcher Unterschied der Survivin-Expression in der Untersuchung der gleichen Zelllinie zu Stande kommen kann, lässt sich mit einer Beobachtung von Nakahara et al. begründen: Sie zeigten, dass die Wirkung von YM155 auf die Survivin-Expression nicht nur konzentrations-, sondern auch zeitabhängig ist [128]. Vergleicht man vor diesem Hintergrund die Ergebnisse, lässt sich feststellen, dass Zhao et al. lediglich eine Inkubationszeit von 12 bis 24 Stunden mit YM155 gewählt haben [134], in unserer Studie die Zelllinien dagegen bis zu 48 Stunden mit YM155 inkubiert wurden. Bestätigt werden unsere Ergebnisse dabei durch Qin et al. [135], die ebenfalls nach 48 Stunden Inkubationszeit eine konzentrationsabhängige Abnahme der Survivin-Expression darstellen konnten ohne Veränderungen der Expression von XIAP und cIAP1. Damit scheint im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus auch die Inkubationszeit neben der verwendeten YM155-Konzentration eine Rolle zu spielen. So lassen sich zwar die unterschiedlichen Beobachtungen bezüglich der Survivin-Expression erklären, nicht jedoch die Wirkung auf die XIAP-Expression. Zhao et al. zeigten als Einzige einen inhibitorischen Einfluss von YM155 auf die XIAP-Expression [134]. Unsere Beobachtung, in der XIAP unbeeinflusst von YM155 bleibt, deckt sich dagegen mit der Vielzahl der bisherigen Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet [128, 135, 136]. Daher deuten unsere Ergebnisse daraufhin, dass ein spezifischer Zusammenhang zwischen YM155 und der Survivin-Expression besteht, ohne dass die Expression anderer Mitglieder der IAP-Familie dadurch beeinflusst wird.

Da Survivin als ein Apoptose-inhibierendes Molekül gilt, liegt zunächst die Vermutung nahe, dass YM155 durch Survivin-Inhibition Apoptose induziert. Diese Theorie konnten wir durch Nachweis einer PARP-Spaltung in allen Zelllinien bestätigen. Es zeigte sich dabei, dass die PARP-Spaltprodukte als Marker der Apoptose mit steigender YM155-Konzentration vermehrt nachweisbar sind. Diese Beobachtung korreliert mit der konzentrationsabhängigen Inhibition der Survivin-Expression in den entsprechenden Zelllinien. Malhotra et al. [99] zeigten im Adenokarzinom des Ösophagus, dass eine gezielte Blockade von Survivin durch

siRNA zu einer verstärkten Hochregulierung von PARP- und Caspase 3-Spaltprodukten führt. YM155 hat in unserer Studie Ergebnisse erzielt, die mit einer direkten Survivin-Inhibition in den Zelllinien OE19 und OE33 [99] vergleichbar sind. So kommen wir zu dem Ergebnis, dass YM155 im Ösophaguskarzinom als Survivin-Inhibitor wirkt. Unklar ist jedoch weiterhin, welche Art des Zelltods dadurch ausgelöst wird. Zhao et al. [134] konnten in ihrer Studie zum Plattenepithelkarzinom des Ösophagus zwar eine vermehrte PARP-Spaltung, jedoch keine Caspasen-Spaltung feststellen. Ein nicht-apoptotischer, Caspasen-unabhängiger Weg des Zelltods, der von PARP induziert wird, wurde als Auslöser des Zelluntergangs identifiziert: Parthanatos [134]. Im Mammakarzinom konnte ebenfalls eine YM155-induzierte Caspase3-Spaltung festgestellt werden, allerdings wurde der Zelltod durch Autophagie, der ebenfalls eine Caspasen-Aktivierung beinhaltet, als ursächlich betrachtet [133]. Darüber hinaus wird auch eine Caspasen-unabhängige DNA-Schädigung als Wirkungsmechanismus herangezogen, die nur sekundär einen Effekt auf die Survivin-Expression haben [131]. Welche dieser Thesen unterstützt werden sollte, kann auf Grundlage unserer Forschungsergebnisse allerdings nicht festgelegt werden. Es zeigt sich zwar deutlich, dass YM155 einen Einfluss auf die Survivinexpression hat, in welcher Form es allerdings zum Zelluntergang führt, kann nicht eindeutig gesagt werden.

Unabhängig von seinem genauen Wirkmechanismus, zeigt YM155 in klinischen Studien gute Ergebnisse. Sowohl in Kombination mit Radiotherapie [135, 136], als auch mit Chemotherapie [137] führt YM155 zu einer erhöhten Zelluntergangsrate der Tumore bei guter Verträglichkeit im Vergleich zu Therapien ohne YM155. Eine klinische Phase II-Studie, in der 34 Patienten mit einem Stadium III/IV-Melanom mit YM155 als Monotherapie behandelt wurden, zeigte zwar eine gute Verträglichkeit von YM155 jedoch keine signifikanten Erfolge in der Krebsbehandlung [138]. Bisher sind zwar in keiner klinischen Studie schwere Nebenwirkungen von YM155 verzeichnet worden, allerdings werden Bedenken darüber geäußert mit einer Substanz zu arbeiten, deren Wirkungsmechanismus und Wechselwirkungen mit Vorgängen im menschlichen Organismus noch nicht zur Gänze geklärt sind [133]. Viele Ergebnisse stellen die ursprüngliche Funktion von YM155 als Survivin-Inhibitor in Frage. Unsere Beobachtungen bestärken jedoch die Rolle von YM155 als spezifischer Survivin-Inhibitor, auch wenn der genaue Mechanismus des ausgelösten Zelltods nicht abschließend geklärt werden kann. Daher sind genauere Studien zur Funktion von YM155 in menschlichen Zellen, sowohl in maligne veränderten, als auch in gesunden, erforderlich, um eine fundierte und gesicherte Therapie mit YM155 auch langfristig zu ermöglichen.

6. Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde die Expression von Survivin und XIAP im Ösophaguskarzinom, sowie ihre Bedeutung und Nutzen für mögliche Therapieansätze untersucht. Eine Überexpression beider Mitglieder der IAP-Familie wurde bereits in vielen Karzinomen nachgewiesen und war dort oft mit einer schlechten Prognose assoziiert. Nun wurde zunächst an Tumorgewebe beider histologischer Ösophaguskarzinomtypen, dem Adeno- und dem Plattenepithelkarzinom, eine Expressionsanalyse beider IAPs durchgeführt. Bisherige Daten zu XIAP und Survivin im Ösophaguskarzinom sind kontrovers und nicht vollständig. Nach unseren Recherchen wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal die XIAP-Expression im Adenokarzinom des Ösophagus untersucht. Wir konnten bestätigen, dass beide IAPs sowohl im EAC als auch im ESCC im Vergleich zum Normalgewebe überexprimiert sind. Für das ESCC konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Tumorprogression mit der XIAP-Expression und ein hohes Tumorstadium mit der Survivin-Expression korreliert. Darüber hinaus ließ sich im ESCC eine prognostische Relevanz von XIAP nachweisen.

Die Auswertung der Gewebeproben der ausgewählten Patientengruppen zeigte somit eine eindeutige Relevanz von XIAP und Survivin im Ösophaguskarzinom. Daher wurden im nächsten Schritt insgesamt sechs Zelllinien von EAC und ESCC ausgewählt, um die Expression beider IAPs und ihre mögliche Beeinflussung zu untersuchen. Nach Nachweis der Expression in allen Zelllinien wurden verschiedene Substanzen ausgewählt, welche als IAP-Inhibitoren gelten, und ihre Effekte auf die untersuchten Zelllinien getestet. Den beeindruckendsten Effekt hatte dabei YM155, ein Survivin-Inhibitor. Dieser konnte in allen Zelllinien die Survivin-Expression, die Zellviabilität und die Proliferation reduzieren. Der genaue Wirkmechanismus ist zwar noch nicht abschließend geklärt, jedoch gibt diese Arbeit Hinweise darauf, dass eine direkte Survivin-Inhibition mit folglich Apoptose-Induktion grundlegend ist. Somit stellt YM155 eine überaus geeignete Substanz in der zielgerichteten Therapie des Ösophaguskarzinoms dar. Die untersuchten Smac-Mimetics AT406, Birinapant und GDC-0152 konnten in unseren Zellversuchen keinen Effekt *in vitro* erzielen. Dies deckt sich teils mit Ergebnissen anderer Studien. Eine Wirkung in Kombination mit anderen Therapieformen wie Chemo- und Radiotherapie *in vivo* sollte jedoch weiter erforscht werden.

Die Limitationen dieser Arbeit bestehen zum einen im retrospektiven Design und der Fallzahlen. Zum anderen fehlen zur besseren Bewertung der Wirksamkeit der untersuchten IAP-Inhibitoren *in vivo* Experimente. Dennoch wird die Rolle von Survivin und XIAP in der Onkogenese des Ösophaguskarzinoms deutlich und ebnet den Weg für eine weitere Erforschung von IAPs als Ziel einer gerichteten Tumorthherapie im Ösophaguskarzinom.

IV. Literaturverzeichnis

1. Global Burden of Disease Cancer, C., et al., *The Global Burden of Cancer 2013*. JAMA Oncol, 2015. **1**(4): p. 505-27.
2. Pennathur, A., et al., *Oesophageal carcinoma*. The Lancet, 2013. **381**(9864): p. 400-412.
3. Rubenstein, J.H. and N.J. Shaheen, *Epidemiology, Diagnosis, and Management of Esophageal Adenocarcinoma*. Gastroenterology, 2015. **149**(2): p. 302-317 e1.
4. Pennathur, A., et al., *Esophagectomy for T1 esophageal cancer: outcomes in 100 patients and implications for endoscopic therapy*. Ann Thorac Surg, 2009. **87**(4): p. 1048-54; discussion 1054-5.
5. Koch-In-, R., s.H.u.d.G.d.e. Krebs-, and r.i.D.e.V. (Hrsg.), *Krebs in Deutschland 2009/2010*. Berlin, 2013. **9**. **Ausgabe**: p. 28-31.
6. Graf, D. and D. Häussinger, *Ösophaguskarzinom: Therapie ist hoch diversifiziert*. Dtsch Arztebl International, 2015. **112**(39): p. -6-.
7. Graf, D., et al., *[Multimodal treatment of esophageal carcinoma]*. Dtsch Med Wochenschr, 2014. **139**(42): p. 2141-7.
8. Gnant, M. and P.M. Schlag, *Chirurgische Onkologie: Strategien und Standards für die Praxis*. 2008: Springer Science & Business Media: p.157
9. Trivers, K.F., S.A. Sabatino, and S.L. Stewart, *Trends in esophageal cancer incidence by histology, United States, 1998-2003*. Int J Cancer, 2008. **123**(6): p. 1422-8.
10. Arnold, M., et al., *Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012*. Gut, 2015. **64**(3): p. 381-7.
11. Vaughan, T.L., et al., *Obesity, alcohol, and tobacco as risk factors for cancers of the esophagus and gastric cardia: adenocarcinoma versus squamous cell carcinoma*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1995. **4**(2): p. 85-92.
12. Zendejdel, K., et al., *Risk of esophageal adenocarcinoma in achalasia patients, a retrospective cohort study in Sweden*. Am J Gastroenterol, 2011. **106**(1): p. 57-61.
13. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S-3-Leitlinie Diagnostik und Therapie der Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome des Ösophagus, Langversion 1.0, 2015, AWMF Registernummer:021/023OL, (Zugriff am: 29.09.2015)*. 2015.
14. Lagergren, J., et al., *Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma*. N Engl J Med, 1999. **340**(11): p. 825-31.
15. Shaheen, N.J. and J.E. Richter, *Barrett's oesophagus*. Lancet, 2009. **373**(9666): p. 850-61.
16. Schnell, T.G., et al., *Long-term nonsurgical management of Barrett's esophagus with high-grade dysplasia*. Gastroenterology, 2001. **120**(7): p. 1607-1619.
17. Guh, D.P., et al., *The incidence of co-morbidities related to obesity and overweight: a systematic review and meta-analysis*. BMC Public Health, 2009. **9**: p. 88.
18. Lee, C.H., et al., *Carcinogenetic impact of alcohol intake on squamous cell carcinoma risk of the oesophagus in relation to tobacco smoking*. Eur J Cancer, 2007. **43**(7): p. 1188-99.
19. Portale, G., et al., *Modern 5-year survival of resectable esophageal adenocarcinoma: single institution experience with 263 patients*. J Am Coll Surg, 2006. **202**(4): p. 588-96; discussion 596-8.
20. Böcker, W., Denk, H. , Heitz, Ph. U. , Höfler, G., *Pathologie*. Vol. 5. Auflage. 2012, München: Elsevier GmbH: p.545-54
21. Wittekind, C. and A. Tannapfel, *[The current TNM system for gastrointestinal tumors part I]*. Pathologe, 2010. **31**(5): p. 344-7.
22. Schuhmacher, C., et al., *[The new TNM classification of tumors of the esophagogastric junction. Surgical consequences]*. Chirurg, 2012. **83**(1): p. 23-30.

23. Godoy, M.C., et al., *Multimodality imaging evaluation of esophageal cancer: staging, therapy assessment, and complications*. *Abdom Imaging*, 2013. **38**(5): p. 974-93.
24. Polkowski, M., *Endosonographic staging of upper intestinal malignancy*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2009. **23**(5): p. 649-61.
25. Wittekind, C., *Pathologie und Klassifikation des Ösophagus- und Magenkarzinoms - Aspekte der derzeitigen Tumorklassifikation*. *klinika*, 2014.
26. Behrens, A., et al., *[Esophageal precancerous lesions: early diagnosis, treatment, and preservation of quality of life]*. *Internist (Berl)*, 2013. **54**(6): p. 683-90.
27. Ell, C., et al., *Curative endoscopic resection of early esophageal adenocarcinomas (Barrett's cancer)*. *Gastrointest Endosc*, 2007. **65**(1): p. 3-10.
28. Briez, N., et al., *Effects of hybrid minimally invasive oesophagectomy on major postoperative pulmonary complications*. *Br J Surg*, 2012. **99**(11): p. 1547-53.
29. Biere, S.S., et al., *Minimally invasive versus open oesophagectomy for patients with oesophageal cancer: a multicentre, open-label, randomised controlled trial*. *Lancet*, 2012. **379**(9829): p. 1887-92.
30. Bollschweiler, E., et al., *Neoadjuvant treatment for advanced esophageal cancer: response assessment before surgery and how to predict response to chemoradiation before starting treatment*. *Chin J Cancer Res*, 2015. **27**(3): p. 221-30.
31. Bosset, J.F., et al., *Chemoradiotherapy followed by surgery compared with surgery alone in squamous-cell cancer of the esophagus*. *N Engl J Med*, 1997. **337**(3): p. 161-7.
32. Seufferlein, T., *Gastrointestinale Onkologie: aktuelle Diagnostik und Therapie*. 2009: Wiss. Verlag-Ges.: p.8-10
33. Ostheimer, C., et al., *[What does the general and abdominal surgeon need to know about radiotherapy? - aspects of radiotherapy in general and abdominal surgery]*. *Zentralbl Chir*, 2015. **140**(1): p. 83-93.
34. Allum, W.H., et al., *Guidelines for the management of oesophageal and gastric cancer*. *Gut*, 2011. **60**(11): p. 1449-72.
35. Screening, P.D.Q. and B. Prevention Editorial, *Esophageal Cancer Prevention (PDQ(R)): Health Professional Version, in PDQ Cancer Information Summaries*. 2002, National Cancer Institute (US): Bethesda (MD).
36. Belkhiri, A. and W. El-Rifai, *Advances in targeted therapies and new promising targets in esophageal cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(3): p. 1348-58.
37. Hong, T.S., J.Y. Wo, and E.L. Kwak, *Targeted therapies with chemoradiation in esophageal cancer: development and future directions*. *Semin Radiat Oncol*, 2013. **23**(1): p. 31-7.
38. Pecorino, L., *Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics*. 2012: Oxford university press: p. 150-168
39. Hengartner, M.O., *The biochemistry of apoptosis*. *Nature*, 2000. **407**(6805): p. 770-6.
40. Hiddemann, W., C.R. Bartram, and H. Huber, *Die Onkologie: Teil 1: Epidemiologie-Pathogenese-Grundprinzipien der Therapie*. 2013: Springer-Verlag: p.152-161
41. Altieri, D.C., *Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms*. *Biochem J*, 2010. **430**(2): p. 199-205.
42. Nagata, S., *Apoptosis by death factor*. *Cell*, 1997. **88**(3): p. 355-65.
43. Cecconi, F., *Apaf1 and the apoptotic machinery*. *Cell Death Differ*, 1999. **6**(11): p. 1087-98.
44. Daugas, E., et al., *Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis*. *FEBS Lett*, 2000. **476**(3): p. 118-23.
45. Ceballos-Cancino, G., et al., *Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin*. *Oncogene*, 2007. **26**(54): p. 7569-75.
46. Barr, P.J. and L.D. Tomei, *Apoptosis and its role in human disease*. *Biotechnology (N Y)*, 1994. **12**(5): p. 487-93.
47. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(4): p. 277-88.
48. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.

49. Koff, J.L., S. Ramachandiran, and L. Bernal-Mizrachi, *A time to kill: targeting apoptosis in cancer*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(2): p. 2942-55.
50. Ambrosini, G., C. Adida, and D.C. Altieri, *A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma*. Nature medicine, 1997. **3**(8): p. 917-921.
51. LaCasse, E.C., et al., *The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer*. Oncogene, 1998. **17**(25): p. 3247-3259.
52. Srinivasula, S.M. and J.D. Ashwell, *IAPs: what's in a name?* Mol Cell, 2008. **30**(2): p. 123-35.
53. Eckelman, B.P., G.S. Salvesen, and F.L. Scott, *Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family*. EMBO Rep, 2006. **7**(10): p. 988-94.
54. Pop, C. and G.S. Salvesen, *Human caspases: activation, specificity, and regulation*. J Biol Chem, 2009. **284**(33): p. 21777-81.
55. Liu, Z., et al., *Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 1004-8.
56. Roy, N., et al., *The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy*. Cell, 1995. **80**(1): p. 167-78.
57. Koonin, E.V. and L. Aravind, *The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(5): p. 223-4.
58. Green, D.R., *Apoptosis: physiology and pathology*. 2011: Cambridge University Press.
59. Finlay, D., et al., *Small-molecule IAP antagonists sensitize cancer cells to TRAIL-induced apoptosis: roles of XIAP and cIAPs*. Mol Cancer Ther, 2014. **13**(1): p. 5-15.
60. Finlay, D., et al., *Inducing death in tumor cells: roles of the inhibitor of apoptosis proteins*. F1000Res, 2017. **6**: p. 587.
61. Qiu, X.B. and A.L. Goldberg, *The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and caspase-9*. J Biol Chem, 2005. **280**(1): p. 174-82.
62. Ma, L., et al., *Survivin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway*. Cell Death Differ, 2006. **13**(12): p. 2079-88.
63. Richter, B.W., et al., *Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(13): p. 4292-301.
64. Verdecia, M.A., et al., *Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement*. Nature Structural Biology, 2000. **7**(7): p. 602-608.
65. Altieri, D.C., *Validating survivin as a cancer therapeutic target*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 46-54.
66. Bolton, M.A., et al., *Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(9): p. 3064-77.
67. Giodini, A., et al., *Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin*. Cancer Res, 2002. **62**(9): p. 2462-7.
68. Pavlyukov, M.S., et al., *Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation*. J Biol Chem, 2011. **286**(26): p. 23296-307.
69. Jiang, G., et al., *Survivin may enhance DNA double-strand break repair capability by up-regulating Ku70 in human KB cells*. Anticancer Res, 2009. **29**(1): p. 223-8.
70. Coumar, M.S., et al., *Treat cancers by targeting survivin: just a dream or future reality?* Cancer Treat Rev, 2013. **39**(7): p. 802-11.
71. Fell, V.L. and C. Schild-Poulter, *Ku Regulates Signaling to DNA Damage Response Pathways through the Ku70 von Willebrand A Domain*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(1): p. 76-87.
72. Ghosh, J.C., et al., *Hsp60 regulation of tumor cell apoptosis*. J Biol Chem, 2008. **283**(8): p. 5188-94.
73. Kang, B.H. and D.C. Altieri, *Regulation of survivin stability by the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein*. J Biol Chem, 2006. **281**(34): p. 24721-7.
74. Fortugno, P., et al., *Regulation of survivin function by Hsp90*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 13791-6.

75. Altieri, D.C., *Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(1): p. 61-70.
76. Deveraux, Q.L., et al., *X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases*. Nature, 1997. **388**(6639): p. 300-4.
77. Shiozaki, E.N., et al., *Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9*. Mol Cell, 2003. **11**(2): p. 519-27.
78. Huang, Y., et al., *Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain*. Cell, 2001. **104**(5): p. 781-90.
79. Shiozaki, E.N. and Y. Shi, *Caspases, IAPs and Smac/DIABLO: mechanisms from structural biology*. Trends Biochem Sci, 2004. **29**(9): p. 486-94.
80. Wu, G., et al., *Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO*. Nature, 2000. **408**(6815): p. 1008-12.
81. Baud, V. and M. Karin, *OPINION Is NF-kappa B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls*. Nature Reviews Drug Discovery, 2009. **8**(1): p. 33-40.
82. Lu, M., et al., *XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization*. Mol Cell, 2007. **26**(5): p. 689-702.
83. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-99.
84. Mehrotra, S., et al., *IAP regulation of metastasis*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 53-64.
85. Soleimanpour, E. and E. Babaei, *Survivin as a Potential Target for Cancer Therapy*. Asian Pac J Cancer Prev, 2015. **16**(15): p. 6187-91.
86. O'Connor, D.S., et al., *Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells*. Am J Pathol, 2000. **156**(2): p. 393-8.
87. Castro-Gamero, A.M., et al., *Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid, an inhibitor of Sp1-mediated survivin transcription, induces apoptosis and acts synergistically with chemo-radiotherapy in glioblastoma cells*. Invest New Drugs, 2013. **31**(4): p. 858-70.
88. Obexer, P. and M.J. Ausserlechner, *X-linked inhibitor of apoptosis protein - a critical death resistance regulator and therapeutic target for personalized cancer therapy*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 197.
89. Bai, L., D.C. Smith, and S. Wang, *Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics*. Pharmacol Ther, 2014. **144**(1): p. 82-95.
90. Fulda, S. and D. Vucic, *Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer*. Nat Rev Drug Discov, 2012. **11**(2): p. 109-24.
91. Amaravadi, R.K., et al., *A Phase I Study of the SMAC-Mimetic Birinapant in Adults with Refractory Solid Tumors or Lymphoma*. Mol Cancer Ther, 2015. **14**(11): p. 2569-75.
92. Dohi, T., et al., *An IAP-IAP complex inhibits apoptosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34087-90.
93. Dohi, T., F. Xia, and D.C. Altieri, *Compartmentalized phosphorylation of IAP by protein kinase A regulates cytoprotection*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 17-28.
94. Hu, D., et al., *Cleavage of survivin by Granzyme M triggers degradation of the survivin-X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) complex to free caspase activity leading to cytolysis of target tumor cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(24): p. 18326-35.
95. Li, C., et al., *Clinicopathological and prognostic significance of survivin over-expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44764.
96. Hoffmann, A.C., et al., *Preoperative survivin mRNA detection in peripheral blood is an independent predictor of outcome in esophageal carcinoma*. Pharmacogenomics, 2010. **11**(3): p. 341-7.
97. Zhu, H., et al., *High expression of survivin predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma following radiotherapy*. Tumour Biol, 2011. **32**(6): p. 1147-53.
98. Wang, Y., et al., *Downregulation of survivin by RNAi inhibits the growth of esophageal carcinoma cells*. Cancer Biol Ther, 2005. **4**(9): p. 974-8.

99. Malhotra, U., et al., *Prognostic value and targeted inhibition of survivin expression in esophageal adenocarcinoma and cancer-adjacent squamous epithelium*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e78343.
100. Rosato, A., et al., *Survivin in esophageal cancer: An accurate prognostic marker for squamous cell carcinoma but not adenocarcinoma*. Int J Cancer, 2006. **119**(7): p. 1717-22.
101. Zhou, S., et al., *Prognostic significance of XIAP and NF-kappaB expression in esophageal carcinoma with postoperative radiotherapy*. World J Surg Oncol, 2013. **11**: p. 288.
102. Ui, T., et al., *The HSP90 inhibitor 17-N-allylamino-17-demethoxy geldanamycin (17-AAG) synergizes with cisplatin and induces apoptosis in cisplatin-resistant esophageal squamous cell carcinoma cell lines via the Akt/XIAP pathway*. Oncol Rep, 2014. **31**(2): p. 619-24.
103. Zhang, S., et al., *XIAP is highly expressed in esophageal cancer and its downregulation by RNAi sensitizes esophageal carcinoma cell lines to chemotherapeutics*. Cancer Biol Ther, 2007. **6**(6): p. 973-80.
104. Zhou, S., et al., *MicroRNA-381 enhances radiosensitivity in esophageal squamous cell carcinoma by targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein*. Onco Targets Ther, 2017. **10**: p. 2527-2538.
105. Rick, W., *Klinische Chemie und Mikroskopie*. 2013: Springer-Verlag.
106. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
107. Remmele, W. and H.E. Stegner, *[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]*. Pathologe, 1987. **8**(3): p. 138-40.
108. Clem, R.J., J.M. Hardwick, and L.K. Miller, *Anti-apoptotic genes of baculoviruses*. Cell Death Differ, 1996. **3**(1): p. 9-16.
109. Kato, J., et al., *Expression of survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy*. Int J Cancer, 2001. **95**(2): p. 92-5.
110. Grabowski, P., et al., *Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma*. Br J Cancer, 2003. **88**(1): p. 115-9.
111. Takeno, S., et al., *Survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma: its prognostic impact and splice variant expression*. Eur J Cardiothorac Surg, 2010. **37**(2): p. 440-5.
112. Mega, S., et al., *Immunohistochemical analysis of nuclear survivin expression in esophageal squamous cell carcinoma*. Dis Esophagus, 2006. **19**(5): p. 355-9.
113. Dabrowski, A., et al., *Assessment of prognostic significance of cytoplasmic survivin expression in advanced oesophageal cancer*. Folia Histochem Cytobiol, 2004. **42**(3): p. 169-72.
114. Hui, M.K., et al., *Clinical correlation of nuclear survivin in esophageal squamous cell carcinoma*. Med Oncol, 2012. **29**(5): p. 3009-16.
115. Vallbohmer, D., et al., *Survivin, a potential biomarker in the development of Barrett's adenocarcinoma*. Surgery, 2005. **138**(4): p. 701-6; discussion 706-7.
116. Li, F., et al., *Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance?* Int J Cancer, 2005. **114**(4): p. 509-12.
117. Tamm, I., et al., *Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1796-803.
118. Ramp, U., et al., *XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas*. Hum Pathol, 2004. **35**(8): p. 1022-8.
119. Nemoto, T., et al., *Expression of IAP family proteins in esophageal cancer*. Exp Mol Pathol, 2004. **76**(3): p. 253-9.
120. Flygare, J.A., et al., *Discovery of a potent small-molecule antagonist of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins and clinical candidate for the treatment of cancer (GDC-0152)*. J Med Chem, 2012. **55**(9): p. 4101-13.

121. Condon, S.M., et al., *Birinapant, a smac-mimetic with improved tolerability for the treatment of solid tumors and hematological malignancies*. *J Med Chem*, 2014. **57**(9): p. 3666-77.
122. Allensworth, J.L., et al., *Smac mimetic Birinapant induces apoptosis and enhances TRAIL potency in inflammatory breast cancer cells in an IAP-dependent and TNF-alpha-independent mechanism*. *Breast Cancer Res Treat*, 2013. **137**(2): p. 359-71.
123. Fulda, S., *Promises and Challenges of Smac Mimetics as Cancer Therapeutics*. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(22): p. 5030-6.
124. Qin, Q., et al., *Smac mimetic compound LCL161 sensitizes esophageal carcinoma cells to radiotherapy by inhibiting the expression of inhibitor of apoptosis protein*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(3): p. 2565-74.
125. Xu, Y., et al., *Role of Smac in determining the chemotherapeutic response of esophageal squamous cell carcinoma*. *Clin Cancer Res*, 2011. **17**(16): p. 5412-22.
126. Mak, D.H., et al., *Tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid inhibits growth and induces death of leukemia cells independent of Cdc2 and survivin*. *Leuk Lymphoma*, 2007. **48**(4): p. 774-85.
127. Park, R., et al., *Systemic treatment with tetra-O-methyl nordihydroguaiaretic acid suppresses the growth of human xenograft tumors*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(12): p. 4601-9.
128. Nakahara, T., et al., *YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts*. *Cancer Res*, 2007. **67**(17): p. 8014-21.
129. Cheng, Q., et al., *Suppression of survivin promoter activity by YM155 involves disruption of Sp1-DNA interaction in the survivin core promoter*. *Int J Biochem Mol Biol*, 2012. **3**(2): p. 179-97.
130. Feng, W., A. Yoshida, and T. Ueda, *YM155 induces caspase-8 dependent apoptosis through downregulation of survivin and Mcl-1 in human leukemia cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **435**(1): p. 52-7.
131. Glaros, T.G., et al., *The "survivin suppressants" NSC 80467 and YM155 induce a DNA damage response*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012. **70**(1): p. 207-12.
132. Winter, G.E., et al., *The solute carrier SLC35F2 enables YM155-mediated DNA damage toxicity*. *Nat Chem Biol*, 2014. **10**(9): p. 768-73.
133. Vequaud, E., et al., *YM155 potently triggers cell death in breast cancer cells through an autophagy-NF-kB network*. *Oncotarget*, 2015. **6**(15): p. 13476-86.
134. Zhao, N., et al., *YM155, a survivin suppressant, triggers PARP-dependent cell death (parthanatos) and inhibits esophageal squamous-cell carcinoma xenografts in mice*. *Oncotarget*, 2015. **6**(21): p. 18445-59.
135. Qin, Q., et al., *Small-molecule survivin inhibitor YM155 enhances radiosensitization in esophageal squamous cell carcinoma by the abrogation of G2 checkpoint and suppression of homologous recombination repair*. *J Hematol Oncol*, 2014. **7**: p. 62.
136. Iwasa, T., et al., *Radiosensitizing effect of YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, in non-small cell lung cancer cell lines*. *Clin Cancer Res*, 2008. **14**(20): p. 6496-504.
137. Iwasa, T., et al., *Marked anti-tumour activity of the combination of YM155, a novel survivin suppressant, and platinum-based drugs*. *Br J Cancer*, 2010. **103**(1): p. 36-42.
138. Lewis, K.D., et al., *A multi-center phase II evaluation of the small molecule survivin suppressor YM155 in patients with unresectable stage III or IV melanoma*. *Invest New Drugs*, 2011. **29**(1): p. 161-6.
139. Dizdar, L., et al., *Clinicopathological and functional implications of the inhibitor of apoptosis proteins survivin and XIAP in esophageal cancer*. *Oncol Lett*, 2018. **15**(3): p. 3779-3789.

V. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Risikofaktoren für die Entstehung eines Ösophaguskarzinoms

Tabelle 2: TNM-Klassifikation der Ösophaguskarzinome und der Karzinome des gastro-ösophagealen Übergangs

Tabelle 3: AJCC/UICC- Stadieneinteilung des Ösophaguskarzinoms

Tabelle 4: Endkonzentrationen und Lösungsmittel der verwendeten Compounds im CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay.

Tabelle 5: Endkonzentrationen und Lösungsmittel der verwendeten Compounds im Zellproliferations-ELISA

Tabelle 6: Zusammensetzung der SDS-Trenngele bei 10ml Gesamtvolumen pro Gel

Tabelle 7: Zusammensetzung des SDS-Sammelgels bei 4ml Gesamtvolumen pro Gel

Tabelle 8: Auswertung der HRP-Immunhistochemie durch Erstellung eines IRS

Tabelle 9: TMA – Charakteristika

Tabelle 10: Korrelation zwischen Survivin-/XIAP-Expression und klinisch pathologischen Parametern von Adenokarzinomen des Ösophagus und ösophago-gastralen Übergangs

Tabelle 11: Korrelation zwischen Survivin-/XIAP-Expression und klinisch pathologischen Parametern von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus

Tabelle 12: Univariate Analyse des Gesamtüberlebens von Ösophaguskarzinompatienten

Tabelle 13: Multivariate Analyse des Gesamtüberlebens von Ösophaguskarzinompatienten

Abb. 1: Schematischer Ablauf der Apoptose (modifiziert nach Peccorino 2012 und Hiddemann 2010)

Abb. 2: Struktureller Aufbau aller bekannten Mitglieder der humanen IAP-Familie (modifiziert nach Finlay 2017 und Green 2011)

Abb. 3: Funktionen von Survivin (modifiziert nach Coumar et al. 2013)

Abb. 4: Aufbau von XIAP und Funktion der BIR-Domänen

Abb. 5: Übersichtsabbildung einer TMA-Stanze in 10x10facher Vergrößerung

Abb. 6: Repräsentative Bilder der Immunhistochemie.

Abb. 7: Survivin und XIAP-Expression in Tumor- und Normalgewebe im Vergleich

Abb. 8: Positive Korrelation zwischen XIAP- und zytoplasmatischer SVV-Expression in entsprechenden EAC-Proben

Abb. 9: IAP-Expressionslevel und ihre Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern

Abb. 10: Kaplan-Meier-Kurve zur Darstellung der prognostischen Wertigkeit der XIAP-Expression in ESCC

Abb. 11: Grundexpression auf Proteinebene von Survivin, XIAP, CIAP1 und CIAP 2 in Plattenepithelkarzinom-Zelllinien (K30, K270, K410, K520) und Adenokarzinom-Zelllinien (OE 19, OE33) des Ösophagus

Abb. 12: Logarithmische Auswertung des CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay nach 48h Inkubation im YM155

Abb. 13: Auswertung des Zellproliferations-ELISA nach 48h Inkubation mit YM155

Abb. 14: Logarithmische Auswertung des CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay nach 48h Inkubation mit GDC und Birinapant

Abb. 15: Logarithmische Auswertung des CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay nach 48h Inkubation mit AT406

Abb. 16: Logarithmische Auswertung des CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay nach 48h Inkubation mit M4N

Abb. 17: Logarithmische Auswertung des Proliferations-ELISA nach 48h Inkubation mit M4N

Abb. 18: Detektion von Survivin, XIAP und der PARP-Spaltprodukte in Ösophagus-Zelllinien nach 48 Stunden Inkubation mit YM155.