

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel

Die Expression von Survivin und XIAP in verschiedenen Tumor-
kompartimenten des chirurgisch resezierten Magenkarzinoms:
XIAP als prognostischer Marker beim diffusen und
gemischten Typ des Adenokarzinoms nach Lauren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin in
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Monika Tomczak

2019

Angaben der Referenten

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

gez.:

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

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Andreas Krieg

Zweitgutachter: Univ.- Prof. Dr. med. Georg Pongratz

für meine Schwester

Auflistung der Publikationen

I. „Role of survivin as prognostic and clinicopathological marker in gastric cancer: a meta-analysis. Andreas Krieg, Billur Baseras, Monika Tomczak, Pablo E. Verde, Nikolas H. Stoecklein, Wolfram T. Knoefel; Molecular biology reports 40, 5501-5511 (2013).

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

II. “Survivin and XIAP Expression in Distinct Tumor Compartments of Surgically Resected Gastric Cancer: XIAP as a Prognostic Marker in Diffuse and Mixed Type Adenocarcinomas”; Levent Dizdar, Monika Tomczak, Thomas Werner, Sami A. Safi, Jasmin C. Riemer, Pablo E. Verde, Nikolas H. Stoecklein, Wolfram T. Knoefel and Andreas Krieg: . Oncology letters **14**, 6847-6856, doi:10.3892/ol.2017.6999 (2017).

Zusammenfassung

Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass Mitglieder der Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) Familie eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung spielen. Schon mehrfach wurden die beliebtesten Mitglieder der IAPs Survivin und XIAP als Biomarker in verschiedenen Tumoren nachgewiesen. In unserer Studie konzentrierten wir uns gezielt auf die Evaluation der Expression beider IAPs in verschiedenen Tumorkompartimenten von Magenkarzinomen wie dem Tumorzentrum, der Invasionsfront und der dazugehörigen Lymphknotenmetastase. Die Gewebeproben aus den untersuchten Magenkarzinomen stammten von Patienten, die in der Allgemein- und Viszeralchirurgie des Uniklinikums Düsseldorf im Zeitraum von 1999 bis 2013 behandelt wurden.

Tissue Microarrays, bestehend aus Tumorzentrum, Invasionsfront des Tumors, korrespondierender Normalmukosa und Lymphknotenmetastasen, konnten von 201 Patienten mit primären Magenkarzinomen angefertigt werden. Die IAP Expression wurde durch immunhistochemische Färbung dargestellt und analysiert. Die Intensität der Expressionen der IAPs wurde mit klinikopathologischen Parametern und dem Gesamtüberleben korreliert.

Zunächst ergab die immunohistochemische Auswertung eine stärkere Expression von Survivin und XIAP im Magenkarzinom im Vergleich zur Normalmukosa. Zudem konnte eine hohe Expression der beiden Proteine im intestinalen Tumortyp, gut differenzierten Karzinomen und in Tumoren mit niedrigem UICC Stadium evaluiert werden. Es konnte eine erhöhte XIAP Expression in Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum Primärtumor festgestellt werden. Zusätzlich konnte die Überexpression von XIAP im gemischten und diffusen Typen nach Lauren als unabhängiger negativer prognostischer Faktor evaluiert werden.

Unsere Ergebnisse führen zu der Feststellung, dass Survivin und XIAP vermutlich schon in der frühen Phase der Karzinogenese des Magenkarzinoms einen erheblichen Einfluss haben. Die erhöhte Expression von XIAP in Lymphknotenmetastasen weist darüber hinaus darauf hin, dass IAPs möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Metastasierung spielen. Obwohl die erhöhte XIAP Expression im gemischten Typ und im diffusen Typ des Magenkarzinoms mit einer schlechten Prognose verbunden war, bieten sich gerade für diese histologischen Typen des Magenkarzinoms Möglichkeiten zu Erforschung und Etablierung neuer zielgerichteter Therapien.

Abstract

There is strong evidence that members of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family play an important role in tumorigenesis. Several times the most popular members of the IAPs Survivin and XIAP have been detected as biomarkers in various tumors. In our study we focused specifically on the evaluation of the expression of both IAPs in different tumor compartments in gastric carcinomas, such as the tumor center, the invasion front and the associated lymph node metastasis. The tissue samples from the investigated gastric carcinomas were from patients treated in general and visceral surgery at the University of Düsseldorf in the period from 1999 to 2013.

A tissue microarray consisting of the tumor invasion front, corresponding normal mucosa and lymph node metastases was prepared from 201 patients with primary gastric carcinoma. IAP expression was visualized by immunohistochemical staining and analyzed. The intensity of the expression of the IAPs was correlated with clinicopathological parameters and overall survival.

First, the immunohistochemical evaluation revealed a stronger expression of survivin and XIAP in gastric carcinoma compared to normal mucosa. In addition, a high expression of both proteins in the intestinal tumor type, well-differentiated carcinomas and in tumors with low UICC stage could be evaluated. We investigate increased XIAP expression in lymph node metastases compared to the primary tumor. In addition, overexpression of XIAP in the mixed and diffuse type according to Lauren could be evaluated as an independent negative prognostic factor.

Our results suggest that Survivin and XIAP are likely to have a significant impact in the early stages of carcinogenesis of gastric carcinoma. The increased expression of XIAP in lymph node metastases also indicates that IAPs may play an important role in metastasis. Although the increased XIAP expression in the mixed and type of gastric carcinoma was associated with a poor prognosis, this histological types of gastric carcinoma offers opportunities to explore and establish new targeted therapies.

Abkürzungsverzeichnis

AEG	Adenokarzinome des ösophagogastralen Übergangs
Apaf1	Apoptotic protease activating factor
ATM-Kinase	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein-Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BIR- Domäne	Baculovirus IAP Repeat
CA	Carcinoma Antigen
CARD –Domäne	Caspase activation and recruitment Domäne
CDH 1 Gen	Cadherin 1 Gen
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CRM1	Chromosome region maintenance 1/ Exportin 1
CT	Computertomographie
C2TA	class II major histocompatibility complex transactivator
D 1/2/3	Department 1/2/3
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DISC	death-inducing signaling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMR	Endoskopische Mukosaresektion
ESD	Endoskopische Mukosadisektion
FADD	Fas-associated death domain protein
FAK	Focal Adhesion Kinase
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
Fas-Rezeptor	First apoptosis signal-receptor , Apo-1 oder CD95
G	Grading
HBXIP	Hepatitis B-interacting Protein
HE-Schnitt	Hämatoxylin-Eosin Schnitt
HER 1/2	human epidermal growth factor receptor
HET-E	heterokaryon incompatible- E
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
HR	Hazard Ratio
HtrA2/ Omi	Serine protease High temperature requirement A2
I	Invasionsfront
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
IgG	Immunglobulin G
ILF3/ NF110	Interleukin enhancer binding factor
INCEP	Inner centromere Protein
IKK2	IKK- β , inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
IRS	Immunreaktiven Score
JKN	c-Jun N-terminale Kinasen
K	Kontrolle
LK	Lymphknoten
LRR	leucine-rich repeat
M	Metastase
MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase 7,
n	Anzahl
N	Nodus/ Nodal
NAIP/ BIRC1	neuronal apoptosis inhibitory protein
NF κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NG	Normalgewebe
n-SSV	Nukleäres Survivin
Omi/ HtrA 2	HtrA (high-temperature requirement) serine peptidase 2
OP	Operation
p53	Protein 53

P54nrb	54 kDa nuclear RNA- and DNA-binding protein
PBS (+ 0.1%)	Phosphate-Buffered Saline
pH	potentia Hydrogenii
pT/ N	Pathologisch Tumorstadium/ Nodus
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie
PP-Score	Positive Percentage-Score
R	Resektionsrand/-status
RING Domäne	Really interesting gene Domäne
SI	Staining Intensity
Smac/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI
Sp1	specifity protein 1
SSV	SurvivinTumor
T	Tumor
TAK1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1
TEP	Thioester containing protein
TMA	tissue microarray
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
TRADD	TNF receptor-associated death domain
TRAF 1/2	TNF receptor-associated factor 1/2
UBCH5/ UBE2D1	ubiquitin conjugating enzyme E2 D1
UICC	Union internationale contre le cancer
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
UL	Ulzeration
WHO	World Health Organization
XAF-1	XIAP-associated factor 1
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein
5-FU	5-Fluorouracil
Wt	Wildtyp
zSSV	zytosolisches Survivin

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Das Magenkarzinom	1
1.2 Epidemiologie	1
1.3 Ätiologie, Pathogenese und Risikofaktoren	1
1.3.1 Klassifikation, Einteilung und Histologie	2
1.4 Diagnose und Staging	6
1.5 Therapie und Prognose	6
1.6 IAPs, Survivin und XIAP	10
1.6.1 Apoptose	10
1.6.2 Die Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) Familie	12
1.6.3 Survivin	14
1.6.3.1 Survivin in der zielgerichteten Therapie	17
1.6.4 XIAP	19
1.6.4.1 XIAP in der zielgerichteten Therapie	20
1.7 Ziel dieser Arbeit	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.2 Patientenmaterial	27
2.2.1 Klinische Variablen	28
2.3 Methoden	31
2.3.1 Der Tissue Microarray	31
2.3.2 Herstellung der TMAs	32
2.3.2.1 Gewebeprobenauswahl	32
2.3.2.2 Technische Herstellung TMA	32
2.3.3 Immunhistochemie an den TMAs	36
2.3.3.1 Die Streptavidin-Biotin Komplexmethode (ABC-Methode)	36
2.3.3.2 Vorgang bei der Immunhistochemie	38
2.3.4 Die Antikörper	39
2.3.5 Auswertung der Immunhistochemie	39
2.3.6 Statistische Analyse	41

3. Ergebnisse.....	43
3.1 Patienten und Ergebnisse	43
3.2 Survivin und XIAP Expression im Magenkarzinom	43
3.3 Korrelation zwischen Survivin und XIAP mit klinikopathologischen Faktoren.....	48
3.4 Einfluss Survivin und XIAP auf Überleben und Prognose	52
3.4.1 Intestinaler Typ.....	52
3.4.2 Gemischter Typ und diffuser Typ nach Lauren	53
4. Diskussion	57
5. Zusammenfassung	64
Literaturverzeichnis.....	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung Apoptose.....	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung struktureller Aufbau IAPs.....	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Wirkung von Survivin	18
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Wirkung von XIAP	22
Abbildung 5: Patientenauswahl entsprechend der Einschlusskriterien	28
Abbildung 6: Manual Tissue Arrayer	33
Abbildung 7: Herstellung eines Tissue Microarray	34
Abbildung 8: HE- gefärbter TMA Schnitt nach immunhistochemischer Behandlung mit entsprechender Anordnung	35
Abbildung 9: Prinzip der (Streptavidin-) ABC-Methode	37
Abbildung 10: Beispiele immunhistochemische Färbung SSV und X-linked inhibitor of apoptosis	44
Abbildung 11: XIAP und Survivin (SSV) Expression	45
Abbildung 12: Boxplots der Ausprägung von Survivin (SSV) und XIAP.....	46
Abbildung 13: Korrelation zwischen XIAP und zytoplasmatischem Survivin.....	47
Abbildung 14: Gesamtüberleben Patienten.....	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika der histologischen Einteilung nach Lauren.....	3
Tabelle 2:TNM-Klassifikation nach UICC	4
Tabelle 3: Stadieneinteilung des Magenkarzinoms nach UICC.....	5
Tabelle 4: Kriterien für eine endoskopische Resektion beim Magenfrühkarzinom	9
Tabelle 5: IAPs und ihre wichtigsten Funktionen.....	14
Tabelle 6: Survivin Varianten	15
Tabelle 7: Geräte	24
Tabelle 8: Reagenzien	25
Tabelle 9: Verbrauchsmaterial	26
Tabelle 10: Antikörper und Kits	26
Tabelle 11: Klinikopathologische Charakteristika des Patientenkollektivs	30
Tabelle 12: Einteilung PP-Score	40
Tabelle 13: Eiteilung SI-score	40
Tabelle 14: IRS- Werte	41
Tabelle 15.1: Korrelation klinikopathologische Faktoren mit Survivin und XIAP	49
Tabelle 15.2: Korrelation klinikopathologische Faktoren mit Survivin und XIAP	50
Tabelle 15.3: Korrelation klinikopathologische Faktoren mit Survivin und XIAP	51
Tabelle 16: Univariate Überlebensanalyse	54
Tabelle 17: Multivariate Überlebensanalyse.....	55

1. Einleitung

1.1 Das Magenkarzinom

Weltweit konnten im Jahr 2018 1.030.000 Magenkarzinom-Fälle registriert werden. Damit steht es aktuell auf Position sechs der häufigsten Krebserkrankungen. Global stellt es mit 783 000 Todesfällen die dritthäufigste Ursache karzinombedingter Todesfälle im Jahr 2018 dar.¹ Europa hat dabei einen Anteil von 140 000 Neuerkrankungen jährlich, womit das Magenkarzinom hier die sechsthäufigste Tumorerkrankung repräsentiert. Leider wird es erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert, was einen kurativen Therapieansatz erschwert und eine schlechte Prognose bedingt.^{2,3}

1.2 Epidemiologie

Das Magenkarzinom nimmt mit 118 200 Todesfällen pro Jahr in Europa den fünften Rang der karzinombedingten Todesursachen ein.⁴ Jährlich erkranken in Deutschland circa 15.000 Personen daran.⁵ Seit mehr als 30 Jahren lässt sich zwar ein stetiger Rückgang der magenkarzinombedingten Sterberaten beobachten, dennoch muss jeder 52. Mann und jede 74. Frau in Deutschland damit rechnen, in ihrer/seiner Lebenszeit an einem Magenkarzinom zu erkranken. Im Durchschnitt erkranken Männer im Alter von 72 und Frauen mit 74 Jahren.³ Allgemein treten Magenkarzinome bei älteren Patienten auf, mit der höchsten Inzidenz im fünften und sechsten Lebensjahrzehnt. Männer sind zwei bis dreimal häufiger betroffen.² Das Auftreten des Magenkarzinoms unterliegt dabei großen geographischen Schwankungen. Am häufigsten tritt es in Japan, Asien, Südamerika und einigen Entwicklungsländern auf. Im Gegensatz dazu wird in den USA und Westeuropa eine niedrige Inzidenz verzeichnet. Zusätzlich kann in diesen Regionen eine Abnahme der Erkrankungshäufigkeit beobachtet werden.⁵

1.3 Ätiologie, Pathogenese und Risikofaktoren

Das Krankheitsrisiko können bestimmte Erkrankungen, Ernährungsgewohnheiten und genetische Faktoren erhöhen. Bei den Erkrankungen ist vor allem die Typ B Gastritis zu nennen, der eine Infektion mit *Helicobacter pylori* vorangeht. Sie stellt insbesondere für Magenkarzinome des Corpus und Antrums bzw. für distale Magenkarzinome einen wesentlichen Risikofaktor dar. Bei über 90 % aller am Magenkarzinom erkrankten Patienten kann eine *Helicobacter pylori* Gastritis anamnestisch evaluiert werden.^{5,6} Zudem konnte ein sechsfach höheres Erkrankungsrisiko bei Infizierten nachgewiesen werden. Die Typ-B Gastritis stellt somit die wichtigste Präkanzerose dar.⁷

Weitere Erkrankungen, die mit einem erhöhten Karzinomrisiko einhergehen, sind die chronische atrophische Autoimmungastritis (Typ A) mit perniziöser Anämie, die ein 10 % höheres Entartungsrisiko bedingt und der Zustand nach Magenteilresektion, mit resultierender Typ C/R Gastritis, bei der sich 15-20 Jahre nach Operation ein Magencarcinom entwickeln kann. In diesem Kontext sind adenomatöse Magenpolypen, deren Karzinominzidenz mit bis zu 20 % angegeben wird und die Riesenfaltengastritis (Morbus Ménétrier), bei der eine Karzinominzidenz von 10 % beschrieben werden konnte, zusätzlich zu erwähnen.^{2,5}

Ein ernährungsbedingtes Entartungsrisiko ist vor allem auf den Konsum von getrockneten, geräucherten und gesalzenen Speisen zurückzuführen. Zusätzlich wirken auch Nahrungsbestandteile wie Aflatoxine karzinogen.⁵

Als genetische Ätiologien können die Mutation des E-Cadherin Gens, oder andere Konstellationen des genetischen Materials, wie sie bei HNCCP (hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom), FAP (familiäre adenomatöse Polyposis), Peutz-Jeghers Syndrom, Li Fraumeni-Syndrom und anderen unbekanntem Mutationen, die bei positiver Familienanamnese anzutreffen sind, genannt werden.⁸ Bei bereits alleiniger positiver Familienanamnese steigt das Risiko von Verwandten ersten Grades ca. um das Dreifache. Betrifft die Erkrankung mehr als einen Verwandten ersten Grades, muss sogar mit einem zehnfach erhöhten Risiko gerechnet werden.⁹

1.3.1 Klassifikation, Einteilung und Histologie

Die Klassifikation der Magenkarzinome wird insbesondere nach der WHO/UICC vorgenommen. Der Differenzierungsgrad wurde ebenfalls durch die WHO definiert. Aus diesem lassen sich folgende Differenzierungsgrade ableiten: G1 entspricht einem gut, G2 einem mäßig, G3 einem schlecht differenzierten und G4 einem undifferenzierten Karzinom.⁸

Eine für das Resektionsausmaß und die Therapie entscheidende Klassifikation ist die histologische Einteilung nach Lauren. Dabei wird ein intestinaler Typ von einem diffusen Typ unterschieden und um den gemischten Typ ergänzt, der beide Merkmale aufweist. Der intestinale Typ macht etwa 50 % aus und weist noch eine Drüsenform auf. Er gilt als besser differenziert und begrenzt, so dass ein geringerer Sicherheitsabstand zum chirurgischen Resektionsrand ausreichend ist. Der diffuse Typ macht ungefähr einen Anteil von 40 % aus. Er ist schlechter differenziert. Drüsige Strukturen sind selten, oder fehlen gänzlich, wohingegen Siegelringzellen verstärkt vorzufinden sind. Der diffuse Typ wächst infiltrierend in die Magenwand, dabei kann die Magenmukosa oft makroskopisch unauffällig wirken, was eine problematische Einschätzung des Krankheitsgeschehens bedingt. Bei diesem Typ ist die Begrenzung der Tumorausdehnung

nur schwer zu bestimmen und es müssen größere Sicherheitsabstände im Rahmen der Resektion eingehalten werden. Der diffuse Typ neigt zudem auch zur früheren lymphatischen Metastasierung. Der Mischtyp macht etwa fünf bis 10 % der Magenkarzinome aus. Er weist beide Charakteristika auf. Er dehnt sich auf das Magenumen und die Magenwand aus. Das chirurgische Resektionsausmaß gleicht dem des diffusen Typs.^{8,10} Die Typen nach Lauren zeichnen sich noch durch weitere Merkmale aus, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind.

Aus der TNM-Klassifikation (Tabelle 2) lassen sich die UICC-Stadien (Tabelle 3) ableiten. Über diese ist eine Definition des Krankheitsstadiums möglich und damit die Konkretisierung eines Therapieansatzes. Zusätzlich wird eine realistische Einschätzung des Therapieerfolgs und der Prognose ermöglicht.¹⁰

Tabelle 1: Charakteristika der histologischen Einteilung nach Lauren

Morphologische, klinische und epidemiologische Charakteristika des diffusen und intestinalen Magenkarzinoms		
Merkmal	Intestinaler Typ	Diffuser Typ
Makroskopie	Exophytisch, polypös, fokal	Ulzerierend, diffus
Mikroskopie	Glandulär	Keine geordnete Architektur, Siegelringzellen
Vorläuferläsion	Atrophische Gastritis, intestinale Metaplasie	Nichtatrophische Gastritis,
Prä maligne Läsion	Adenomdysplasie, „Correra Sequenz“	Foveoläre Hyperplasie
Alter	Höheres Alter	Alle Altersgruppen, insbesondere auch Jüngere
Geschlecht	Männer > Frauen	Männer = Frauen
Prädilektionsstelle	Antrum, Angulusfalte	Gesamter Magen, vor allem Korpus
Metastasen	Lymphknoten, Leber	Lymphknoten, diffuse Ausbreitung in benachbarte Strukturen
Assoziation zu H. pylori	Wichtigster Risikofaktor	Wichtigster Risikofaktor

(Tabelle modifiziert nach¹¹)

Tabelle 2: TNM-Klassifikation nach UICC

T- Klassifikation	
TX	Primärtumor kann nicht bestimmt werden
T0	Keine Evidenz für einen Primärtumor
Tis	Infiltration der Lamina propria oder der Tela submucosa
T1a	Infiltration der Lamina propria oder Lamina muscularis mucosae
T1b	Infiltration der Tela submucosa
T2	Infiltration der Tunica muscularis
T3	Infiltration des subserösen Bindegewebes ohne Invasion des viszeralen Peritoneums oder benachbarter Strukturen. T3 schließt auch Tumoren ein, welche sich entlang des gastrocolischen oder gastrohepatischen Ligaments ausbreiten, sowie das Omentum majus oder minus erreichen, ohne Durchdringung des viszeralen Peritoneums, welches diese Strukturen umgibt
T4	Infiltration von Nachbarorganen (Milz, Colon transversum, Leber, Zwerchfell, Pankreas, Bauchwand, Nebenniere, Niere, Dünndarm oder Retroperitoneum)
T4a	Infiltration der Serosa (viszerales Peritoneum)
T4b	Infiltration von Nachbarorganen (Milz, Colon transversum, Leber, Zwerchfell, Pankreas, Bauchwand, Nebenniere, Niere, Dünndarm oder Retroperitoneum)
N-Klassifikation	
NX	Befall lokaler Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine lokalen Lymphknoten befallen
N1	Metastasen in ein bis zwei lokalen Lymphknoten
N2	Metastasen in drei bis sechs lokalen Lymphknoten
N3	Metastasen in sieben oder mehr lokalen Lymphknoten
M- Klassifikation	
M0	Keine Fernmetastasen nachgewiesen
M1	Fernmetastasen

Legende: T= Tumor; N=Nodus; M=Metastase (nach UICC)

Tabelle 3: Stadieneinteilung des Magenkarzinoms nach UICC

Stadien	TNM		
Stadium 0	Tis		
Stadium Ia	T1	N0	M0
Stadium Ib	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stadium IIa	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIb	T1	N3	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
Stadium IIIa	T2	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N1	M0
Stadium IIIb	T3	N3	M0
	T4a	N2	M0
	T4b	N0, N1	M0
Stadium IIIc	T4a	N3	M0
	T4b	N2,N3	M0
Stadium IV	Jedes T	Jedes N	M1

Legende: T=Tumor; N=Nodus; M=Metastase

1.4 Diagnose und Staging

Anamnestisch können unspezifische Symptome wie Gewichtsverlust, Widerwillen gegen Fleisch, Brechreiz, Druckgefühl im Oberbauch, Leistungsknick und subfebrile Temperatur bei fortgeschrittener Krankheit auffallen. In protrahierten Stadien und bei Metastasierung können ein Aszites, Hepatomegalie, oder ein Virchow Lymphknoten klinisch imponieren. In laborchemischen Untersuchungen kann eventuell eine Eisenmangelanämie nachgewiesen werden und sich auch klinisch bemerkbar machen. Bei einer Stuhluntersuchung kann gegebenenfalls der Nachweis von okkultem Blut gelingen.⁸ Die Tumormarker (Cancer- Antigen 72-4, Cancer-Antigen 19-9, Carcinoembryonales Antigen) können bestimmt werden und davon unabhängig für die postoperative Nachsorge verwendet werden.^{12,8} In Deutschland stellt nach wie vor die Endoskopie/Gastroskopie das wichtigste Untersuchungsverfahren zur Detektion des Magenkarzinoms dar und ist zugleich das Standardverfahren in der Primärdiagnostik. Durch sie ist es möglich, gezielt Biopsien aus auffälligen Bereichen zu entnehmen.¹² Der weiterführenden Diagnostik und dem präoperativen Staging dienen die Sonographie, die Endosonographie, sowie eine CT- Bilddiagnostik von Abdomen und Thorax. Es können auch eine PET-CT (Positronen-Emissions-Tomografie) und eine Laparoskopie bei Bedarf angeschlossen werden. Eine Knochenszintigraphie sollte nur bei klinischer Indikation durchgeführt werden.¹⁰ Die Sonographie dient vor allem dem Auffinden und Beurteilen von Fernmetasten, insbesondere beim Vorkommen in der Leber. Die Endosonographie ist besonders nützlich zur Begutachtung der Ausdehnung des Tumors, vor allem beim kurativen Therapieansatz. Zum Ausschluss einer Fernmetastasierung, gilt die Durchführung eines CT-Abdomen/Thorax auch als unerlässlich. Laparoskopische Untersuchungstechniken werden eher in den fortgeschrittenen Stadien genutzt beziehungsweise empfohlen. Die Laparoskopie ermöglicht zusätzlich die Evaluation von Fernmetastasen und einer Peritonealkarzinose. Dadurch kann die Notwendigkeit einer Laparotomie eventuell reduziert werden.^{12,13}

1.5 Therapie und Prognose

Die Wahl des Therapieansatzes hängt im Wesentlichen vom Krankheitsstadium des Patienten ab. Magenfrühkarzinome, bei denen sich die Infiltration auf die Mukosa begrenzt, können durch endoskopische Verfahren kurativ abgetragen werden. Dies gilt vor allem für Karzinome bis einschließlich T1a.¹⁴ In diesem Stadium liegt die Wahrscheinlichkeit der LK-Metastasierung bei unter 5 %. Dem Behandler stehen hierfür insbesondere zwei interventionelle Techniken zur Verfügung, die EMR (endoskopische Mukosaresektion) und ESD (endoskopische submukosale Dissektion).¹⁵

Ab dem Stadium T1b muss hingegen eine chirurgische Resektion und Lymphadenektomie erfolgen.¹⁶

Einen Überblick der Kriterien für die endoskopische Resektion kann der Tabelle 4 entnommen werden. Bei einem guten Differenzierungsgrad (G1, G2), einer Eindringtiefe unter 20 mm und fehlender Ulzeration ist eine kurative Resektion wahrscheinlich.

Ab dem Stadium T1b stellt die chirurgische Resektion des Tumors, mit Entfernung der regionären Lymphknoten von Kompartiment I und II (D2-Lymphadenektomie), die Standardtherapie mit kurativem Ansatz dar. Dabei ist das primäre Ziel, tumorfreie Resektionsränder (R0) zu erreichen, da nur diese als potentiell kurativ eingestuft werden können. Es gilt hierbei, die für die jeweiligen histologischen Typen definierten Sicherheitsabstände einzuhalten. Beim intestinalen Typ ist ein oraler Sicherheitsabstand von fünf Zentimetern und beim diffusen Typ von acht Zentimetern einzuhalten.^{17,18}

Damit ein N0 Status klassifiziert werden kann, müssen mindestens 16 von 25 resezierten Lymphknoten als tumorfrei bewertet werden können.¹⁵ Der Resektion folgt die chirurgische Rekonstruktion der Magendarmpassage. Nach einer totalen Gastrektomie erfolgt diese durch eine nach Roux-Y ausgeschaltete Jejunalschlinge, eine Pouch-Bildung, oder durch eine isoperistaltische Jejunalschlinge zwischen Ösophagus und Duodenum. Bei der subtotalen Gastrektomie wird durch die Gastrojejunostomie die Nahrungspassage wiederhergestellt.⁸ Für das weitere therapeutische Procedere ist das nach Resektion erreichte Tumorstadium bzw. der R-Status entscheidend. Dabei bedeutet R0, dass nach chirurgischer Intervention histologisch kein Tumor an den Schnittträgern des Resektats nachzuweisen ist. Bei R1 hingegen ist an den Schnittträgern mikroskopisch ein Residualtumor zu erkennen und bei R2 ist auch nach Resektion ein Tumorrest makroskopisch erkennbar verblieben. Nach dem chirurgischen Eingriff und histopathologischer Aufarbeitung des Resektats wird das Stadium nach UICC anhand der TNM-Klassifikation kategorisiert. Bei einem postoperativen UICC-Stadium I werden keine weiteren therapeutischen Maßnahmen eingeleitet. Befindet sich der Betroffene im Stadium II oder III kann eine adjuvante Chemotherapie in Betracht gezogen werden. Ein postoperatives Stadium IV ist als inoperables, metastasiertes Magenkarzinom einzustufen und auch als solches palliativ zu behandeln.¹⁹

Bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen der Klasse T3 und T4 ist die Möglichkeit einer perioperativen Chemotherapie zu evaluieren und der chirurgischen Resektion voranzustellen. Sie kann zum Downstaging des Tumors führen und gegebenenfalls eine kurative R0-Resektion ermöglichen.¹⁷ Eine neoadjuvante Chemotherapie kann ebenfalls bei primär nicht resektablen Tumoren vorangestellt werden, um eine Operation mit kurativer Zielsetzung anzustreben.⁸ Bei gutem Allgemeinzustand und ausreichender Verträglichkeit, kann zusätzlich eine adjuvante Chemotherapie angeschlossen werden.¹⁷ Ei-

nen therapeutischen Sonderfall stellt die isolierte Metastasierung des Peritoneums dar. Hierbei kann eine radikale Peritonektomie mit intraoperativer Chemotherapie erfolgen und zu einer Verlängerung der Überlebenszeit beitragen.⁸ Bei fortgeschrittenen Karzinomen mit Fernmetastasierung (M1) bzw. des Stadiums IV, wird ein chemotherapeutischer Algorithmus angesetzt und palliative Maßnahmen kommen zur Anwendung. Eine Chemotherapie gilt der alleinigen unterstützenden Versorgung im Hinblick auf das Überleben als überlegen. Cisplatin ist hierbei die führende Substanz und kann patientenabhängig kombiniert werden. Für die Erstlinientherapie wird dabei eine Zweifachtherapie aus zum Beispiel Cisplatin und Capecitabin, oder Oxaliplatin in Kombination mit Fluoropyrimidin, empfohlen. Für stabile Patienten kommt auch eine Tripple-Therapie aus Epirubicin, Cis- oder Oxaliplatin, 5-FU oder Capecitabin, oder ein modifiziertes docetaxelhaltiges Präparat in Frage.²⁰ Ein essentieller Schritt in der Therapiefindung ist die Bestimmung des HER2-Status. Bei Überexpression gilt es eine Behandlung mit Trastuzumab zu integrieren. Das Langzeitüberleben kann beim Vorhandensein eines positiven HER2-Status mit einer zusätzlichen Trastuzumab begleitenden Therapie deutlich verlängert werden (TOGA-Studie).^{15,20,21}

Tabelle 4: Kriterien für eine endoskopische Resektion beim Magenfrühkarzinom

Tiefe	Histologie	Differenziert	Undifferenziert
Mukosakarzinom	UL (-)		
	≤20	EMR	Ggf. Op.
	>20	(ESD)	Op.
	UL(+)		
	≤30	(ESD)	Op.
	>30	Op.	Op.
Submukosakarzinom	Sm1		
	≤30	(ESD)	Op.
	Sm2		
Jede Größe	Op.	Op.	

Tiefe	Histologie	Differenziert	Undifferenziert
Mukosakarzinom	UL (-)		
	≤20	EMR	Ggf. Op.
	>20	(ESD)	Op.
	UL(+)		
	≤30	(ESD)	Op.
	>30	Op.	Op.
Submukosakarzinom	Sm1		
	≤30	(ESD)	Op.
	Sm2		
Jede Größe	Op.	Op.	

Legende: EMR= endoskopische Mukosaresektion; ESD= endoskopische Submukosadissektion; Op=Operation; UL=Ulzeration; Sm Submukosainfiltration (Tabelle modifiziert nach¹⁵)

Die Prognose ist vor allem abhängig vom diagnostizierten TNM-Stadium und wird in der für onkologische Erkrankungen typischen 5-Jahresüberlebensrate ausgedrückt. Bei einem Carcinoma in situ liegt sie nahezu bei 100 %. Beim Frühkarzinom pT1 beträgt sie 90 % und bei pT1 N1 M0, pTN2 N0 M0 sinkt sie um weitere 20 %. In fortgeschrittenen Stadien ist das Resektionsergebnis maßgeblich prognostisch entscheidend. Bei einer R0-Resektion beträgt die 5-Jahresüberlebensrate 45 %, wohingegen sich bei einer R1-Resektion die Prognose stark verschlechtert und fast kein Patient die fünf Jahre überlebt. Zusätzlich wird das Überleben von der Erfahrung des Operateurs und dem Ausmaß der Lymphadenektomie bestimmt.^{8,15}

1.6 IAPs, Survivin und XIAP

1.6.1 Apoptose

Die Apoptose stellt dem programmierten Zelltod dar. Defekte Zellen werden hierbei koordiniert ausgesondert. Dies betrifft zum Beispiel virusinfizierte Zellen oder Tumorzellen. Es wird ein reguliertes Eliminationsprogramm abgespielt. Wichtig ist dieser Vorgang vor allem für die Embryonalentwicklung und für die Einhaltung einer beständigen Zellzahl. Die Zellmembran bleibt hierbei unbeschädigt. Der Zellkern schrumpft und wird gemeinsam mit Zelle fragmentiert und anschließend phagozytiert. Die Dauer der Apoptose kann mehrere Stunden betragen und betrifft Einzelzellen. Der programmierte Zelltod kann über den extrinsischen Weg wie auch über den intrinsischen Weg führen.²² Beim extrinsischen Weg führt der Ablauf der Apoptose über den TNF- α (Tumornekrosefaktor alpha) oder Fas-Ligand (First apoptosis signal-Ligand). Beide Signalwege werden über Rezeptoren der TNF-Familie vermittelt. Nach Bindung von TNF- α beziehungsweise vom Fas-Ligand an die korrespondierenden TNF- Rezeptoren, werden die sogenannten Caspasen aktiviert, allen voran die Caspase 8. Beim TNF- α Weg bindet dieses Zytokin an den TNFR1 (TNF receptor-associated factor 1). Dies führt über die Membranproteine TRADD (TNF receptor-associated death domain) und FADD (Fas-associated death domain protein) zur Aktivierung der Caspase 8, was die Apoptosekaskade in Gang setzt (Abb.1).²³ Der Fas-Rezeptor gehört ebenfalls zur TNF-Familie, an diesen bindet der Fas-Ligand.²⁴ Die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand führt zu Initiierung von DISC (death-inducing signaling complex). In diesen ist FADD involviert und er führt ebenfalls zu Aktivierung der Caspasen 8. Die Caspase 8 wiederum ist in der Lage Effektorcaspasen zu aktivieren (Abb.1). Endonukleasen werden aktiviert, die ihrerseits in der Lage sind die DNA, das Zytoskelett und die Kernlamina zu zersetzen.^{22,25}

Als innere Anzeichen für die Einleitung der Apoptose beziehungsweise zur Initiierung des intrinsischen Wegs gelten Mitochondrienschäden, die zum Beispiel durch Hypoxie verursacht werden. Ein Beispiel hierfür ist auch die DNA-Defekt bedingte Apoptose, die durch das Protein p53 induziert wird, indem es an einen irregulären DNA Abschnitt die ATM- Kinase bindet, was zur Akkumulation von p53 führt. p53 dient als Transkriptionsfaktor für die Proteine der proapoptotischen BAX-Gruppe, die Porinkanäle in der äußeren Mitochondrienmembran etablieren. Hierbei nimmt die Permeabilität der Mitochondrienmembran zu und es kann vermehrt Cytochrom c in Zytoplasma austreten. Sobald Cytochrom c freigesetzt wird, bindet es an Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor) und ATP (Adenosintriphosphat). Der Komplex aus Cytochrom c, Apaf-1 und ATP formiert sich zum sogenannten Apoptosom. Dieses bindet an die Procaspase 9 und kata-

lysiert diese in ihre aktive Form Caspase 9 um. Diese aktiviert dann die Effektor Caspase 3, sowie die Caspasen 7 und 6, was die Apoptosekaskade auslöst und den Zelltod zur Folge hat (Abb.1).^{26 27,28} Außerdem stimuliert der externe Weg durch Auslösung von mitochondrialem Stress auch die intrinsisch initiierte Apoptose. Die beiden Wege sind in dem Sinne nicht voneinander zu trennen.²⁹

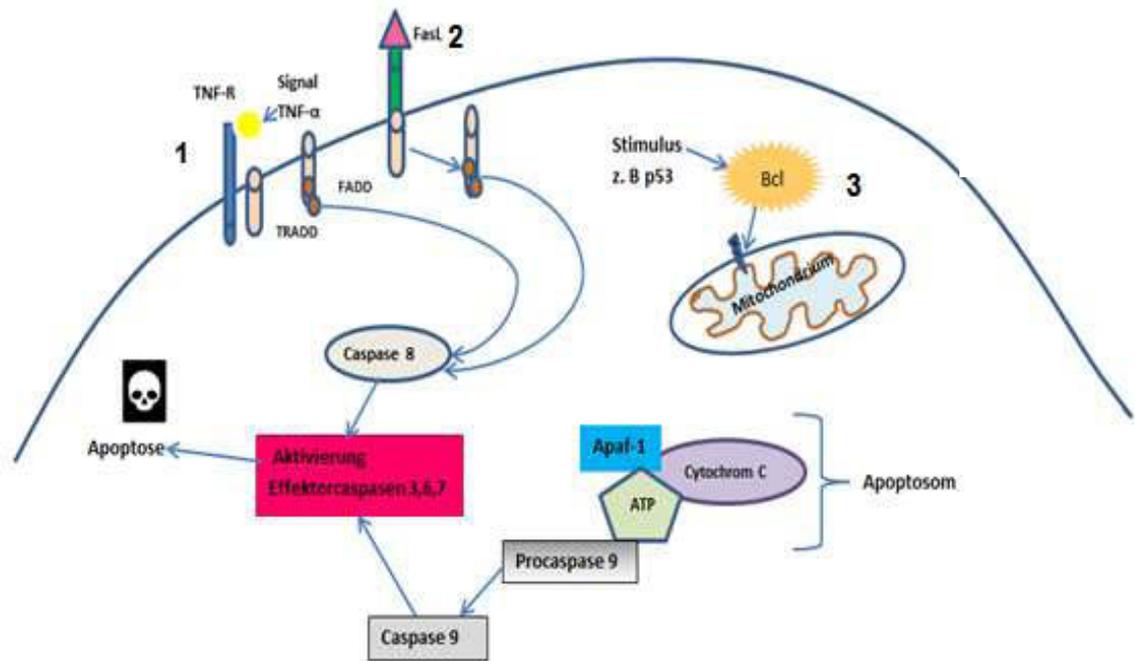


Abbildung 1: Schematische Darstellung Apoptose

1. TNF-R Weg: TNF bindet an TNF-Rezeptor. Todesdomänen bilden eine Struktur, an die Moleküle mit eigener Todesdomäne binden können. Es folgt die Aktivierung von TRADD. Ein Teil des TRADD bindet FADD. Todeseffektordomäne von FADD bildet mit Procaspase 8 einen Komplex und somit wird diese zur aktiven Caspase 8 übergeführt. Die aktive Caspase 8 löst eine Caspasenkaskade aus; **2. FAS-Rezeptor Weg:** An Fas-Rezeptor bindet der Fas-Ligand, das führt zu Bildung von DISC (nicht dargestellt), zu dem auch FADD gehört. Über diesen Prozess wird die Procaspase 8 in die aktive Caspase 8 katalysiert. Die aktive Caspase 8 löst die Apoptosekaskade aus; **3. Intrinsischer Weg:** Stimulus bedingt Permeabilität der Mitochondrienmembran, es tritt vermehrt Cytochrom c in Zytoplasma. Cytochrom c bindet an Apaf und ATP. Komplex aus Cytochrom c, Apaf-f und ATP formiert das sogenannte Apoptosom. Dieses bindet Procaspase 9 und katalysiert diese in ihre aktive Caspase 9. Aktive Caspase 9 setzt die Effektorcaspasen 3, 6,7 in Gang. Es folgt die Apoptose.

1.6.2 Die Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) Familie

Entartetes Gewebe weist im Gegensatz zu gesundem Gewebe die Fähigkeit auf sich dem programmierten Zelltod zu entziehen. Abnorme und geschädigte Zellen haben durch eine Anzahl von Proteinen die Möglichkeit den apoptotischen Zelltod zu inhibieren, um so ein unkontrolliertes Wachstum zu generieren. Durch die molekularen Mechanismen der Apoptoseinhibition können Tumorzellen Therapieresistenzen gegenüber konventionellen Chemotherapeutika induzieren. Allen voran gestellt sei hier die Familie der Inhibitor of Apoptosis Proteine (IAPs). IAPs wurden von Crook et al und Birnbaum et al 1993 erstmalig beschrieben. Durch Genomanalysen bei Baculoviren gelang ihnen die Identifikation Apoptose inhibierender Proteine. Diese sind in der Lage, den unter anderem den durch TNF- α , Chemotherapeutika, oxidativen Stress, ionisierende Strahlen und diversen anderen Agenzien eingeleiteten programmierten Zelltod zu antagonisieren.^{30-32,33,34} Derzeit kennt man acht verschiedene humane IAPs.³⁵ Das erste entdeckte humane IAP war das „neuronal apoptosis inhibitory protein“ (NAIP/ BIRC1). Es wurde zufällig bei der Suche nach Genen entdeckt, die für die autosomal-rezessive Spinal Muscle Atrophy verantwortlich gemacht wurden.³⁶ Es folgte die Beschreibung von cellular IAP1 (cIAP1/BIRC) und cellular IAP2 (cIAP2/BIRC3), denen man eine Interaktion mit den Proteinen TRAF1/2 nachwies, über diese sie mit den TNF-Signalweg assoziiert sind.^{30,37-39} Zusätzlich gelang die Identifikation von fünf weiteren IAPs; XIAP (BIRC4), Survivin (BIRC5), Apollon (BIRC6), Melanoma IAP (ML-IAP oder BIRC7), und IAP-like protein 2 (ILP-2 oder BIRC8).^{31,40-49} Eine kennzeichnende Gemeinsamkeit stellt die sogenannte BIR-Domäne (Baculovirus IAP Repeat –Domäne) dar, eine 70 Aminosäuren umfassende Sequenz, die jedes IAP zumindest einmal besitzt. Ein Teil wird hier von drei Zysteinen und einem Histidin gebildet und stellt den Zink Ion bindenden Bereich beziehungsweise das Zink-Finger Motiv dar. Die BIR Domänen sind für verschiedene Protein-Protein Interaktionen verantwortlich.⁵⁰ Durch Interaktion mit inaktiver Procaspase-9 und den Caspasen 3,7 hemmt die BIR Domäne den programmierten Zelltod. Es kommt dabei zur Inhibierung dieser Caspasen und die IAPs können ihre antiapoptotische Wirkung entfalten.^{32,51-53} Für NAIP ist zusätzlich eine LRR (leucine-rich repeat) und NACHT Domäne beschrieben. Die NACHT Domäne (NACHT, weil gleiche Domäne in Proteinen NAIP, C2TA, HET-E, TEP beschrieben wird) hat wahrscheinlich die Aufgabe einer Nukleosidtriphosphatase.⁵⁴ IAPs sind zudem im Stande auf den Zellzyklus Einfluss zu nehmen, wie es zum Beispiel für Survivin beschrieben wurde, das zum G2/M Zeitpunkt des Zellzyklus vermehrt vorliegt und mit dem Mikrotubulus und der Mitosespindel interagieren kann.⁵⁵ Darüber hinaus können die einzelnen IAPs noch über eine RING-Domäne (Really interesting gene Domäne), bekannt für cIAP1, cIAP2, XIAP, ML-IAP, ILP2, oder über eine CARD-Domäne, wie es

für cIAP1 und cIAP2 beschrieben ist, verfügen. Die RING-Domäne befindet sich in C-terminaler Lage. Sie übernimmt mit Hilfe der Ubiquitinierung den Abbau von Proteinen und beherbergt zusätzlich auch die Fähigkeit der Selbstkatalyse.^{56,57} Über die CARD-Domäne wird ein Zusammenwirken mit Pro-Caspasen und anderen Proteinen ermöglicht.³⁵ cIAP1, cIAP2, XIAP und ILP2 verfügen außerdem über eine UBA- Domäne (ubiquitin associated). Für Apollon ist zudem eine in C-terminaler Lage UBC- Domäne (ubiquitin conjugating) beschrieben.⁵⁸ Eine schematische Darstellung der IAPs bietet Abbildung 2. Die Übersicht der einzelnen IAPs, mit ihren wichtigsten Funktionen, ist der Tabelle 5 zu entnehmen.

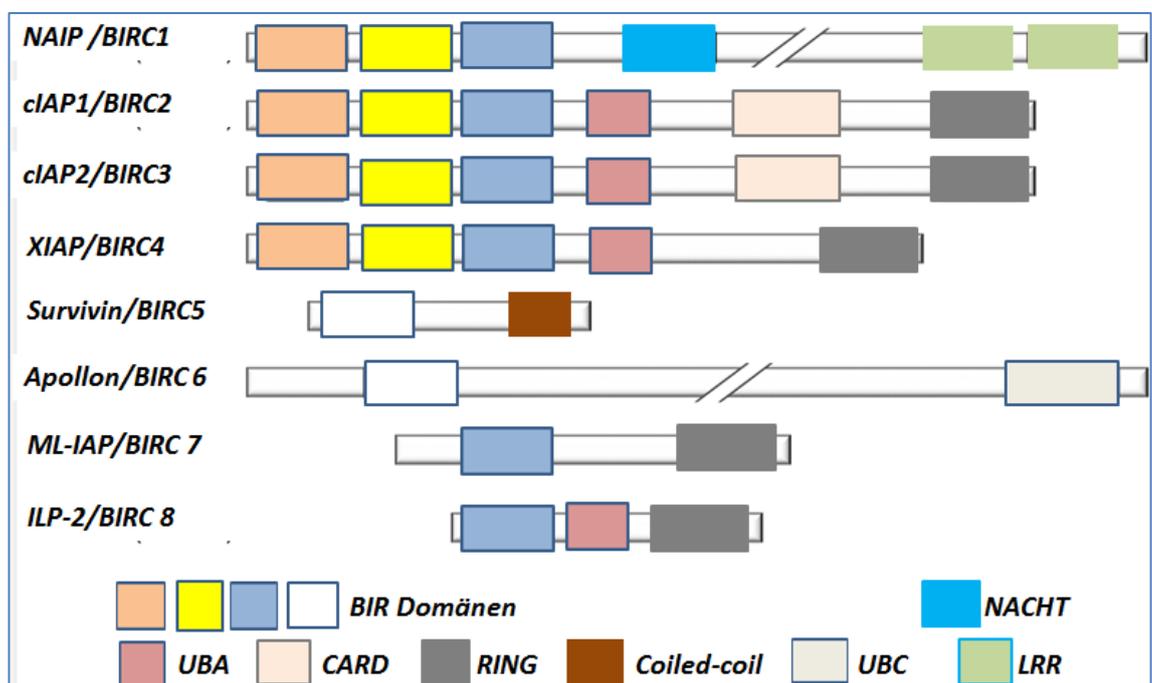


Abbildung 2: Schematische Darstellung struktureller Aufbau IAPs

Legende: CARD= caspase recruitment domain; cIAP1= cellular inhibitor of apoptosis protein 1; cIAP2= cellular inhibitor of apoptosis protein 2; ILP-2 =inhibitor of apoptosis protein-like protein 2; LRR= leucine-rich repeat; ML-IAP= melanoma inhibitor of apoptosis protein; NAIP= neuronal apoptosis inhibitory protein; RING= really interesting new gene; UBA= ubiquitin-associated; UBC = ubiquitin-conjugating.

Tabelle 5: IAPs und ihre wichtigsten Funktionen

IAP	Funktion
NAIP	Neuroprotektion, vermutlich kann Mutation in NAIP-Gen.Locus zum Ausfall ein einer Hemmung der Apoptose von Motoneuronen und trägt zur Entwicklung der spinalen Muskelatrophie bei. ³⁶
clAP1	Signaltransduktion: TNFR, NF-κB-Aktivierung ⁵⁹ , schützt Tumorzellen, zum Beispiel durch TNF induzierte Apoptose via Synergismus MYC-Onkogen, p53 Unterdrückung, Ligase Funktion ⁶⁰⁻⁶² , Förderung Tumorzellinvasion und Metastasierung durch NF-κB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)- induzierte Genepression für Zellmotilität, Invasion, Migration ^{63,64}
clAP2	Signaltransduktion: TNFR, NF-κB-Aktivierung ⁵⁹ , Förderung Tumorzellinvasion und Metastasierung durch NF-κB- induzierte Genepression für Zellmotilität, Invasion, Migration ^{63,64}
XIAP	Apoptose Inhibition, Förderung Tumorzellinvasion und Metastasierung durch NF-κB- induzierte Genepression für Zellmotilität, Invasion, Migration ^{63,64}
Survivin	Mitose (Zytokinese) ⁶⁵⁻⁶⁸ , Inhibition extrinsischen und intrinsischen Apoptose Weg ^{40,69-71} , Stabilisation XIAP ⁷²
BRUCE	Mitose (Zytokinese), Einfluss auf Smac und Caspase (Degradation Smac, Abschwächung Caspase 9 via Ubiquitinierung und folgender Degradation ^{58,73,74}
Livin	Entwicklung, fragliche weitere Mechanismen, Degradation Smac über E3 Ubiquitin Ligase Funktion ⁷⁵
ILP2	Natürlich in humanen Hoden nachgewiesen, vermutliche Inhibition von Apoptose, induziert durch Überexpression von BAX, oder durch Caspase 9 und Apaf 1 ⁴⁸

1.6.3 Survivin

Survivin wurde 1997 von Ambrosini, Adida und Altieri entdeckt und beschrieben. Es wird auf dem Gen 17q25 codiert, besteht aus 142 Aminosäuren und stellt das kleinste IAP dar. Damals gelang es den Entdeckern dieses Protein im malignen fetalen Gewebe nachzuweisen. Hauptsächlich hat Survivin wohl die Aufgabe der Zellzyklus-Kontrolle während der Embryonalentwicklung. Die mRNA von Survivin ist im gesunden Gewebe, mit Ausnahme der Plazenta und des Thymus, nicht nachweisbar.⁴⁰ Die anderen IAPs kommen hingegen auch im normalen adulten Gewebe vor.^{52,76} Im Gegensatz zu den anderen IAPs, weist Survivin nur eine BIR-Domäne auf. Es besitzt keine CARD-Domäne und auch keine RING-Domäne.⁴⁰ Auf genetischer Ebene wird die Transkription von Survivin durch den Transkriptionsfaktor Sp1 (Specificity protein 1) ge-

regelt. Dieses Protein kann direkt an die Promotersequenz des Survivin-Gens binden und dessen Transkription regulieren.^{77,78} Durch alternatives Spleißen wird die Modifizierung des Transkripts beziehungsweise der prä-mRNA zur reifen mRNA ermöglicht. Hierbei werden Introns (nicht kodierende Sequenz der DNA) entfernt und die Exons (kodierende Sequenzen DNA) auf verschiedene Weise neu zusammen gefügt. Daraus resultieren neue beziehungsweise verschiedene Sequenzen der mRNA aus einer prä-mRNA. Auf diese Weise wird ermöglicht, dass ein DNA-Abschnitt mehrere Varianten eines Proteins codiert. Für die Regulierung des Spleißvorgangs sind Splicing-Aktivator- und Splicing-Repressor-Proteine verantwortlich. Sie sind in der Lage Spleißbereiche zu erkennen und entsprechend zu markieren. Die fertig gespleißte mRNA gelangt aus dem Zellkern ins Zytosol und steht zu Translation zur Verfügung. So entstehen Isoformen eines Proteins, die sich in ihrer Aufgabe unterscheiden.^{77,79} Das native Survivin-Gen besteht aus drei Intron und vier Exons.⁸⁰ Durch den Spleißvorgang können verschiedene Survivinvarianten entstehen. Aktuell werden sechs Spleißvarianten beschrieben, der Wildtyp, 2 α , 2B, 3 α , 3B und Δ Ex3.⁸¹⁻⁸³ Survivin selbst zum Beispiel weist eine drei-Intron-vier-Exon-Struktur auf. Survivin-2B besitzt eine Insertion im alternativen Exon 2. Survivin-Delta-Ex-3 fehlt, wie der Name bereits vermuten lässt, das dritte Exon, was zu einer Verschiebung führt, die einen einzigartigen Carboxyl-Terminus bedingt. Das Fehlen des Exons 3 dient vermutlich der Etablierung eines nukleären Lokalisierungssignals. Zusätzlich führt es wohl zu einem mitochondrialen Lokalisierungssignal. Survivin-3B besitzt hingegen eine Insertion eines alternativen Exons 3.⁸⁴ Die einzelnen Varianten können sowohl antiapoptotischen als auch proapoptotischen Einfluss nehmen.⁸³ Zudem sind die verschiedenen Survivin-Varianten auch in der Lage heterodimere Verbindungen untereinander einzugehen. Dadurch kann zum Beispiel eine antiapoptotische Wirkung in eine proapoptotische wechseln, wie es für das Heterodimer aus Survivin 2 α und den Wildtyp-Survivin beschrieben wurde.⁸⁵ Die Wirkung der einzelnen Varianten können der Tabelle 6 entnommen werden.

Tabelle 6: Survivin Varianten

Survivin Variante	Funktion
2 α	Pro-apoptotisch
2B	Pro-apoptotisch
3 α	unbekannt
3B	Anti-apoptotisch
Δ Ex3	Antiapoptotisch
Wt	Antiapoptotisch

Es ist bekannt, dass Survivin Einfluss auf die Zellteilung hat. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die Expression des Proteins in der G2/M Phase des Zellzyklus vermehrt ist.⁷⁷ Es wird vermutet, dass die subzelluläre Lokalisation von Survivin in Nukleus oder Zytoplasma mit der jeweiligen Aufgabe in der Zellzyklus- oder Apoptoseregulation assoziiert ist.⁸⁶ Es koordiniert mitunter die Mitose, indem es zum Beispiel an der Organisation des Mikrotubulus, der Teilungsfurche und allgemein an der Zytokinese beteiligt ist.⁸⁷ Zudem richtet es gemeinsam mit Borealin, Aurorakinase B und INCENP den sogenannten Chromosomen-passenger-complex (CPC) aus. Dieser Komplex unterstützt die chromosomale Segregation und ist an der Regulation der Dynamik beteiligt.^{88 89} Die zytoplasmatische Variante des Proteins wirkt wohl als Apoptose Inhibitor.⁶⁵ Neuere Studien lassen vermuten, dass die Inhibierung der Apoptose indirekt geschieht. Dafür interagiert Survivin wohl mit HBXIP (Hepatitis B-interacting Protein), XIAP oder SMAC/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI).^{90,91} Es ist in der Lage, mit Hilfe des Cofaktors HBXIP den intrinsischen Weg der Apoptose zu inhibieren, indem es die Caspase 9 inaktiviert. Die Bindung von HBXIP an die pro-Caspase 9 stört die Vermittlung von Apaf1, das für die Organisation des Apoptosoms benötigt wird. Eine Störung des Apoptosom verhindert wiederum die Aktivierung der Caspase 9.^{92-94,95} Da Survivin zudem als Vermittler zwischen der Apoptose und dem mitotischen Kontrollpunkt in der G2/M Phase wirkt, lässt sich auch die proonkogene Wirkung des Survivins nachvollziehen. Ein gestörter Ablauf könnte den fehlerhaften Zellen ermöglichen sich den mitotischen Kontrollpunkten zu entziehen und sich ungehindert zu teilen.⁹⁵ Zudem tritt Survivin mit den proapoptotisch wirkenden Smac/DIABLO in Aktion und inhibiert dieses wodurch die Zelle vor dem programmierten Zelltod geschützt wird. Beschrieben ist auch ein Synergismus mit XIAP. Auf einen Apoptosestimulus folgt zusätzlich die Freisetzung von mitochondrialem Survivin ins Zytoplasma. Hier bildet es einen Komplex mit mit XIAP, welcher potenziert gegen die Caspase 9 wirkt. Survivin stabilisiert zudem den Apoptose-Inhibitor XIAP und schützt ihn vor der Ubiquitinierung und somit vor der proteosomalen Degradation.^{72,96} Die geschilderten Prozesse und Mechanismen werden in Abbildung 3 dargestellt. Außerdem stellt Survivin gemeinsam mit CRM1 (Chromosome region maintenance 1/ Exportin 1) den zellkerneigenen Transport dar.⁸⁵ Survivin steht schon länger im Fokus der Tumorforschung und konnte bereits in diversen humanen Malignomen nachgewiesen werden.⁹⁷⁻¹⁰¹ Dies gilt auch für das Magenkarzinom. Auch hier konnte eine prognostische Relevanz in Abhängigkeit von der Survivin-Expression evaluiert werden.^{102,103} Teraschima et al wiesen eine prognostische Signifikanz von Survivin bei an Magenkarzinom Erkrankten nach. In einer weiteren Studie von Li et al wurde festgestellt, dass durch die Herunterregulation von Survivin die Proliferation von humanen Magenkarzinomzellen inhibiert werden konnte.^{103,104} Dies zeichnet Survivin beson-

ders als potentiell Agens für eine zielgerichtete Therapie aus. Erwähnenswert ist auch, dass die Transkription von Survivin durch das Protein p53 reguliert beziehungsweise unterdrückt wird. Eine Fehlfunktion oder Mutation von p53, wie sie in Tumoren oft anzutreffen ist, geht nachweislich auch mit der dysregulierten Produktion von Survivin einher.^{105,106}

1.6.3.1 Survivin in der Zielgerichteten Therapie

Seit der Entdeckung von Survivin wurden zahlreiche Studien veröffentlicht, die dieses IAP als Prognosefaktor, Progressionsfaktor, diagnostischen Faktor oder Therapietarget in den Fokus stellten.^{103,104,107-115} Hinsichtlich dieser Erkenntnisse ist es verständlich, dass die Wissenschaft dieses potentielle Agens für die zielgerichtete Therapie intensiver erforscht hat. Bereits einige niedermolekulare Verbindungen konnten als potentielle Survivin-Antagonisten untersucht werden. Die bewährtesten unter ihnen sind FL118, SPC3042, YM155, NSC80467, LY2181308. NSC80476 ist ein Imidazol Derivat, das mutmaßlich seine Wirkung entfaltet, indem es DNA-Schäden verursacht, wodurch dann, beispielsweise als sekundäres Ereignis, die Transkription von Survivin supprimiert wird.¹¹⁶ FL118 zeigt strukturelle Ähnlichkeit mit dem Topoisomerasehemmer Irinotecan. Es ist in der Lage die Survivin Promoteraktivität selektiv zu inhibieren und somit die Survivin Expression zu hemmen. Zudem ließ sich in In-vivo-Studien eine überlegene Anti-Tumorwirksamkeit in humanen Tumor-Xenograft-Modellen im Vergleich zu Irinotecan, Topotecan, Doxorubicin und 5-FU feststellen. Diese Substanz kann wohl nicht nur Survivin, sondern auch andere Mitglieder der IAP Familie in ihrer Funktion stören.¹¹⁷ Bei SP3042 und LY2181308 handelt es sich um sogenannte Antisense Moleküle. Es sind Moleküle, die mit der Survivin-mRNA in Interaktion treten und die Translation von Survivin verhindern.¹¹⁸ YM155 ist eine auf Imidazol basierende niedermolekulare Verbindung, die sich im Tiermodell als sehr wirksam erwies. Das Nebenwirkungspotential von YM155 konnte als niedrig eingestuft werden und der Einsatz war nicht mit dem gängigen zytostatischen Nebenwirkungsprofil assoziiert.¹¹⁹ Bei den Therapieansätzen wurde YM155 mit Carboplatin und Cisplatin kombiniert und es konnte eine synergistische, potenzierte apoptotische Wirkung erzielt werden. Speziell die inhibierende Wirkung von YM155 auf Survivin war Gegenstand intensiver Forschung und einige Theorien zur dessen Wirkmechanismen wurden bereits postuliert. In einer auf in vitro Versuchen basierenden Studie konnte festgestellt werden, dass YM155 die für die Survivin-Expression zuständige Promoterregion inhibiert und die Expression von Survivin dadurch reduziert wird.¹¹⁹ Es konnten der Transkriptionsfaktor ILF3/NF110 (Interleikin enhancer binding factor) und das Protein p54nrb (54 kDa nuclear RNA- and DNA-binding protein), die ein Komplex bilden, als potentielle Zielstrukturen evaluiert werden. Demnach induziert YM155 eine Dissoziation des Transkriptionskomplexes

1.6.4 XIAP

Das X-linked IAP wird auf Chromosom Xq25 codiert.¹²³ Die Expression von XIAP konnte in allen adulten und fetalen Zellen, mit Ausnahme der peripheren Leukozyten, nachgewiesen werden.¹²⁴ XIAP ist wohl das zurzeit wirkungsvollste bekannte IAP. Es ist im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der IAP Familie in der Lage Caspasen direkt durch Bindung, oder durch eine Ubiquitin-vermittelte Degradation, zu inhibieren.¹²⁵ XIAP beinhaltet drei BIR Domänen und einen carboxyterminalen RING-Zink-Finger. Über die drei BIR Domänen werden die Caspasen 3, 7 und 9 inhibiert.^{52,126-129} Es wird auch angenommen, dass XIAP Caspasen-unabhängig die Apoptose direkt über andere molekulare Signalwege verhindern kann.¹³⁰ XIAP agiert zum Beispiel dabei als Kofaktor im Smad-, JNK- und NF- κ B-Signalweg. Dies konnte durch einen Versuch bestätigt werden, in dem die Bindungsstelle für Caspasen an XIAP verändert wurde, was zum Verlust der Caspaseninhibition führte. Dennoch konnte dieses XIAP Molekül die antiapoptotischen Smad-(Smad= small body size/ MAD= mothers against decapentaplegic), JNK- (c-Jun N-terminale Kinasen) und NF- κ B-Signalwege aktivieren.¹³¹ Dieses Ergebnis bestärkt die Theorie der Caspasen unabhängigen antiapoptotischen Wirkung von XIAP. Die IAP vermittelte Apoptoseinhibition führt auch über NF- κ B. Hierbei führen andere antiapoptotische Mechanismen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der mitunter die Expression von Genen der IAP-Genfamilie reguliert, welche die Zellen vor TNF- α vermittelter Apoptose schützen. NF- κ B aktiviert vor allem die Expression von Genen, die die Zellproliferation fördern und vor der Apoptose schützen. Gerade Krebszellen weisen mutierte Signalproteine auf, die normalerweise der Kontrolle von NF- κ B dienen sollten.¹³² Die Aktivierung von NF- κ B wird mitunter via TNF-Rezeptor durch TRAF2 (TNF receptor-associated factor 1/2) vermittelt.^{133,134} Auch XIAP ist in der Lage NF- κ B zu aktivieren. Die Expression von XIAP führt zu einer erhöhten nukleären Translokation der NF- κ B-p65-Untereinheit in den Zellkern, die in den mitogen-aktivierenden Proteinkinase TAK1/MAP3K7 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1) Signalweg impliziert ist. TAK1 interagiert mit IKK2, sowohl aktives TAK1 als auch XIAP können die IKK2-Kinaseaktivität stimulieren.¹³⁵ IKK2 wiederum phosphoryliert das NF- κ B inhibitorische Protein I κ B α . Daraufhin dissoziiert I κ B α von NF- κ B und NF- κ B ist es möglich in den Zellkern zu gelangen und die Expression von mitunter antiapoptotischen Genen zu aktivieren.¹³⁶ Zudem kann XIAP auch durch seine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität, die sich auf der Ring-Domäne des Proteins befindet, den antiapoptotischen Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren.¹³⁷ Auch eine Wechselwirkung zwischen XIAP und Survivin ist bekannt. Die beiden IAPs bilden als Reaktion auf einen Zelltodstimulus ein Heterodimer. Diese Wechselwirkung fördert die Resistenz gegenüber der Apoptose durch Erhöhung der Stabilität von XIAP. Dies geschieht durch verringerte Polyubiquitinierung von XIAP und der dadurch reduzierten proteosomalen De-

gradation, die vermutlich durch den Ausschluss des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms UbcH5 bedingt wird. Zudem supprimiert der Survivin-XIAP-Komplex synergistisch die Caspase-9 Aktivität, alleine oder im Zusammenhang mit dem Apoptosom.⁷² Der Survivin-XIAP Komplex kann außerdem über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu einer erhöhten Expression von Fibronektin führen.^{138,72} Die im c-terminalen Bereich der IAPs gelegene RING-Domäne mit Ubiquitinligase-Aktivität, ermöglicht den IAPs beziehungsweise XIAP auch sich selbst zu ubiquitinieren und sich so dem Prozess der proteosomalen Degradation auszusetzen.¹³⁹ Auch andere Proteine wie Caspasen 3 und 7 können durch die beschriebene Ligaseaktivität ubiquitiniert und durch die proteosomale Degradation inaktiviert werden.^{140,141} Therapeutika, die diese Ring-Domäne antagonisieren, wären somit im Stande die Apoptose zu induzieren indem sie die Caspasen vor der proteosomalen Degradation schützen könnten.^{142,143}

Natürlicherweise gibt es gegen die antiapoptotische Wirkung von XIAP auch zelluläre Gegenmechanismen. So konnten Smac/Diablo, Omi/HtrA2 und XAF-1 (XIAP-associated factor 1) als Antagonisten charakterisiert werden.¹⁴⁴⁻¹⁴⁷ Omi/Htr2 und Smac/Diablo sind mitochondriale Proteine, die auf einen apoptotischen Stimulus hin ins Zytosol gelangen und dort XIAP binden.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ XAF-1 ist ein nukleäres Protein. Es ist im Stande XIAP direkt zu binden und dieses zu sequestrieren.¹⁴⁴

1.6.4.1 XIAP in der zielgerichteten Therapie

Die Überexpression von XIAP wird in Zusammenhang mit der Entstehung beziehungsweise der Progression von Tumorerkrankungen und damit einhergehender schlechter Prognose gesehen. Ebenso wurde eine Assoziation zwischen dem schlechten Ansprechen auf eine Therapie und der erhöhten Expression von XIAP beschrieben.¹⁵¹⁻¹⁵³

Im Fokus der zielgerichteten Anti-XIAP Therapie liegen derzeit die sogenannten Antisense-Oligonukleotide und kleinmolekulare Inhibitoren. Antisense-Oligonukleotide und kleinmolekulare Antagonisten sollen in der Lage sein, die Apoptose zu induzieren und die Empfindlichkeit hinsichtlich einer Chemotherapie zu potenzieren. Dadurch bieten sich weitere Möglichkeiten zur Entwicklung neuer zielgerichteter Therapeutika. Es gilt jedoch die Forschung in diesem Bereich zu intensivieren.^{130,142}

Eine weitere Therapieoption bieten die niedermolekularen Smac-Mimetika. Wie bereits erwähnt ist Smac/DIABLO ein natürlich vorkommender Inhibitor gegen die IAPs. Er bindet diese und verhindert dadurch deren Caspasen-inaktivierende Wirkung, so dass Caspasen wieder Apoptose induzieren können.¹⁵⁴⁻¹⁵⁶ Diese Bindung wird durch eine am N-Terminalen Ende befindliche Ala-Val-Pro-Ile (AVPI) Sequenz gewährleistet.

Smac/DIABLO fördert durch seine IAP-inhibierende Wirkung ebenso den reibungslosen Ablauf des über den TNF-Rezeptor und Cytochrom c induzierten programmierten Zelltods.^{156,157} In erster Linie gelangt Smac beim intrinsischen Vorgang der Apoptose ins Zytosol. Dies wird vor allem durch die Gruppe der proapoptotischen Mitglieder der Bcl Proteinfamilie initiiert, die Poren in der Mitochondrienmembran bedingen und so den Austritt von Smac, aber auch Cytochrom c, ermöglichen.^{158,159} Smac kann alle IAPs außer NAIP binden, insbesondere auch XIAP über die BIR3 Domäne. Die Caspasen inaktivierende Wirkung der IAPs wird dadurch gestört und die Caspasen können ihre apoptotische Wirkung entfalten. Zusätzlich werden auch IAP-unabhängige proapoptotische Funktionen von Smac beschrieben.¹⁵⁸⁻¹⁶² In einer Reihe von malignen Tumoren wurde die Expression von Smac mit einem geringeren Tumorprogress assoziiert.^{157,163,164} Es konnte zudem beim Magenkarzinom, Osteosarkom und hepatozellulärem Karzinomzelllinien eine verstärkte Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika bei gesteigerter Ausprägung von Smac festgestellt werden.^{151,165,166} In Tumorzelllinien, die eine geringere Expression von Smac aufwiesen, wurde das Gegenteil beobachtet. Zudem wurde von Endo et al postuliert, dass die erniedrigte Expression von Smac/DIABLO mit einer schlechteren Prognose beim kolorektalen Karzinom assoziiert war.^{167,168} Dies verdeutlicht umso mehr die vielversprechenden Möglichkeiten, die Smac-Mimetika als IAP-Antagonisten aufweisen. Smac-Mimetika imitieren die Bindung von Smac/Diablo an XIAP, wodurch sich die pro-apoptotische Wirkung der Caspasen wieder entfalten kann.^{158,164} Die genannten Eigenschaften der Smac-Mimetika bieten somit in XIAP-exprimierenden Tumoren einen aussichtsreichen Therapieansatz.^{169,170,142,171} Die beschriebenen Mechanismen werden in Abbildung 4 dargestellt.

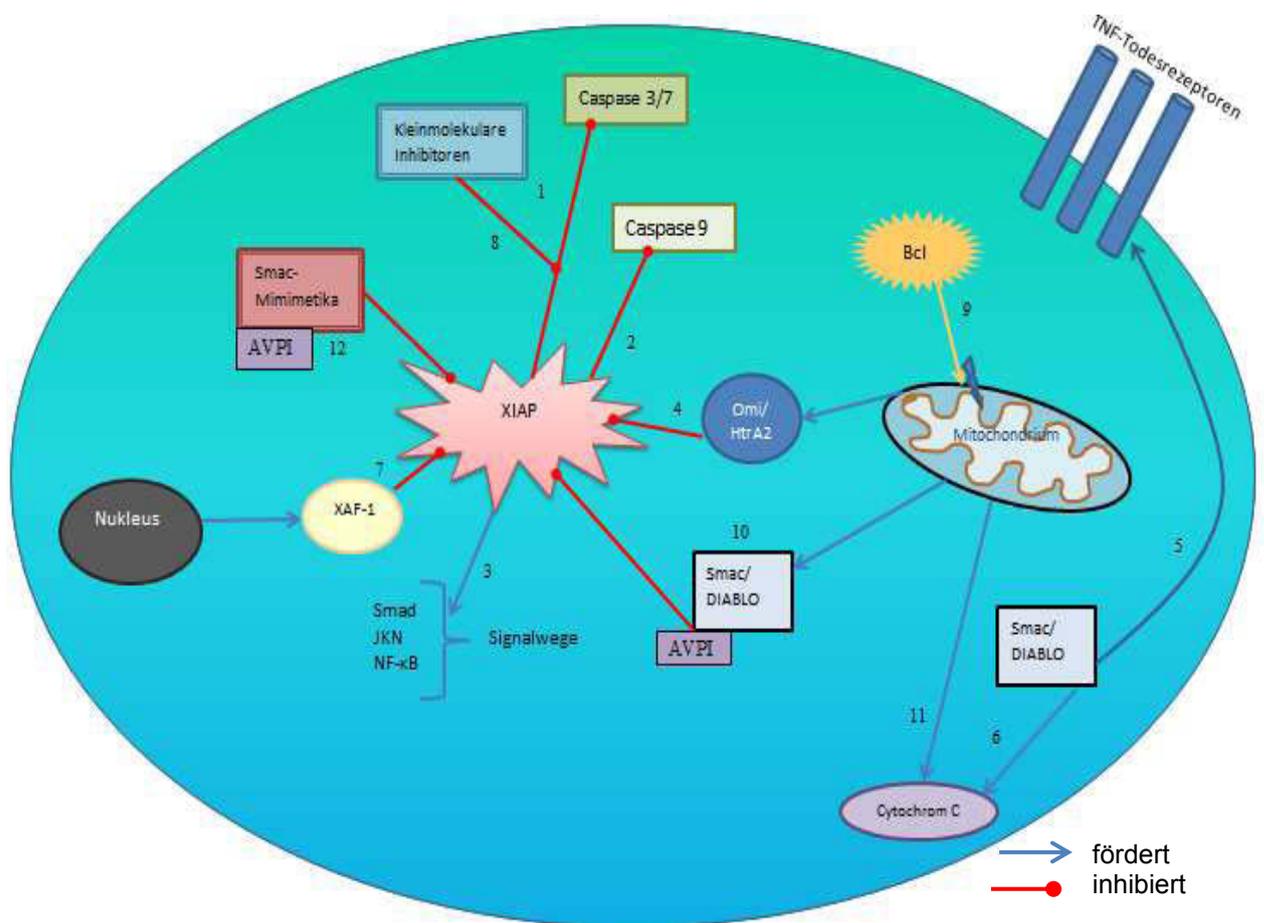


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Wirkung von XIAP

XIAP inhibiert die Caspasen 3, 7 und 9 über die BIR Domäne (1,2). Als Cofaktor ist es in andere antiapoptotische molekulare Signalwege involviert, wie z.B. im Smad-, JNK- und NF-κB-Signalweg (3).

Durch die Ubiquitinligase-Aktivität werden die Caspasen 3 und 7 zudem für die proteosomale Degradation kenntlich gemacht und inaktiviert (im Bild nicht ausführlich dargestellt). Smac/DIABLO, Omi/Htr2 sind mitochondriale Proteine, die auf einen apoptotischen Stimulus hin ins Zytosol gelangen und dort XIAP inaktivieren (4). Smac/DIABLO fördert durch die XIAP-inhibierende Wirkung den Ablauf des über den TNF-Rezeptor und Cytochrom c programmierten Zelltodes (5,6). XAF-1 ist ein nukleares Protein, bindet XIAP und sequestriert es (7).

Beispielhaft für zielgerichtete Therapie: kleinmolekularen Inhibitoren, die an der BIR 3 Domäne von XIAPs binden und primär die Interaktion von XIAP und Caspase 9 stören, somit kann der Apoptoseweg über den Caspase 9 Signalweg stattfinden.

Smac-Mimetika: Smac gelangt vor allem beim intrinsischen Vorgang der Apoptose ins Zytosol, insbesondere durch die proapoptotische Gruppe der Bcl-Proteine initiiert. Die Freisetzung von Cytochrom c wird so auch ermöglicht. Smac/DIABLO bindet XIAP durch eine sich am N-terminalen Ende befindliche sogenannte AVPI Sequenz (9, 10,11). Smac-Mimetika binden ebenfalls an XIAP und antagonisieren so dessen antiapoptotische Wirkung (12).

1.7 Ziel dieser Arbeit

Um die Behandlung und das Überleben gerade der Patienten zu verbessern, die sich in fortgeschrittenen Tumorstadien befinden, ist die Etablierung von innovativen Therapien notwendig. Hierbei bietet die zielgerichtete Therapie neue Ansätze, die direkt in Prozesse der Karzinogenese eingreifen können, indem sie auf molekularer Ebene wirken und das Tumorwachstum, die Apoptose, Invasion, Metastasierung und Angiogenese bei der Tumorentstehung regulierend beeinflussen.¹⁷² Gerade auf diesem Gebiet wird den IAPs eine besondere Aufmerksamkeit zuteil. Evidenzbasiert werden ihnen zahlreiche Wirkungen bei der Krebsentstehung zugeschrieben, unter anderen die Fähigkeit zur Resistenzentwicklung, vor allem gegenüber der klassischen Chemotherapie, indem sie gleichermaßen die Proliferation sowie Metastasierung begünstigen sollen.^{62,95,138,173} Ein ganz besonderes Augenmerk gilt dabei auch den IAPs Survivin und XIAP, die bereits in vorherigen Studien intensiv untersucht wurden.^{171,174}

Es wurde demonstriert, dass XIAP und Survivin in der Lage sind auf vielfältige Weise in das zelluläre Geschehen einzugreifen.^{95,138,174-178} Dabei können XIAP und Survivin durch direkte und indirekte Interaktion die metastatische und antiapoptotische Entwicklung der Zelle vorantreiben. Beide Proteine wirken synergistisch und Survivin schützt zusätzlich durch seine Interaktion mit XIAP dieses vor der zellulären Degradation.⁷² Auch in Bezug auf das Magenkarzinom nehmen diese beiden IAPs einen Stellenwert ein. Bereits in vorangegangenen Studien wurde im Magenkarzinom ein Zusammenhang zwischen der Expression von XIAP oder Survivin und klinikopathologischen Parametern nachgewiesen. Zugleich war die Expression von Survivin auch mit einer schlechten Prognose beim Magenkarzinom assoziiert.¹⁷⁹⁻¹⁸⁵ Jedoch haben bisherige immunhistochemische und patientenorientierte Studien die synergistische Wirkung des Survivin-XIAP Komplexes nicht ausreichend berücksichtigt und den pro-invasiven und Metastasen fördernden Einfluss weniger fokussiert. Ein Ziel der vorliegenden Studie war es deswegen, diese gemeinsame Expression und den synergistischen Einfluss dieser IAPs, insbesondere in Bezug auf die Tumorkompartimente des Magenkarzinoms (Tumorzentrum, Invasionsfront, Lymphknotenmetastase) und dem dazu korrespondierenden Normalgewebe zu untersuchen. Ein besonderer Fokus lag hierbei auf der Assoziation zu klinikopathologischen Variablen. Ein weiteres Ziel war es, mögliche prognostische Aussagewerte der beiden IAPs zu evaluieren und zu prüfen. Die Ergebnisse der Untersuchungen führten zur Formulierung eines zusätzlichen Ziels. Hierbei stand die Fragestellung im Fokus, in wie weit die Expression der beiden IAPs, im jeweiligen histologischen Typen nach Lauren des Magenkarzinoms, für die prognostischen Aussagewerte und das Gesamtüberleben eine Rolle spielt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 7: Geräte

Geräte	Produktname	Hersteller
Mikroskop 1	Leica MPS 32	Leica/Wilovert
Mikroskop 2	Leica DMIL	Leica
Stanzgerät	Manual Tissue Arrayer MTA-1	Beecher Instruments
Ofen	Modell 400	MEMMERT
Mikrotom	Leica SM 2000 R	Leica
Kühlschrank	Premium Bio Fresh	Liebherr
Feinwaage	Model KP64C	Voyager PRO
Reagenzglas mixer	Vortex Mixer	VWR
Wasserbad	Ecoline Star Edition	Laude
Schüttelinkubator	Thermomixer comfort	Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	IBS
Pipetten	10-1000 µl	Eppendorf

Tabelle 8: Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
10 x Target Retrieval Solution	Dako
Xylol reinst	Merck
1x PBS Tabletten	Gibco
1x DPBS	Gibco
H ₂ O ₂ (3 %ig)	Merck
ABC-Kit	Zytomed Systems
Antibody diluent	Zytomed Systems
DAB	Dako
Mayers Häkalaun	Merck
Hämtoxylin-Eosin Lösung	Sigma/ Deisenhofen
Streptavidin-HRP-Conjugate	Zytomed Systems
Peroxidase Block	Zytomed Systems
DAB Substrate Buffer	Zytomed Systems
DAB Concentrate	Dako
Entellan	Merck
Tween20	Sigma

Tabelle 9: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Ethanol 99,5-70 %	Roth, Karlsruhe
Liquid Blocker Super Pap Pen Mini (Pap- pen)	MBT Brand
Chamber Slides	Lab- Tek
Objekträger	Eppendorf VWR
Deckgläschen	Eppendorf VWR
Pipettierspitzen	StarLab

Tabelle 10: Antikörper und Kits

Antikörper	Hertseller des Antikörpers
Primärantikörper Survivin, vom Hasen abstammend, polyklonal	NB-500-201; 1:1000 Verdünnung, Novus, Littleton, CO, USA
Primärantikörper XIAP, murin, mono- klonal	Clone 48, 1:50 Verdünnung; BD Biosci- ences, San Jose, CA, USA
Biotinylated secondary Antiboby polyva- lent	Zytomed-Systems
Antikörper zur Kontrolle	murines IgG1 kappa (MOPC-21, abcam, Cambridge UK)
Antikörper zur Kontrolle	Rabbit Immunoglobulin Fraktion (Code X093, Dako, Glostrup, Denmark).

2.2 Patientenmaterial

Bei dem Untersuchungsmaterial handelt es sich um Gewebe von Patienten, die im Zeitraum von 1995-2013 aufgrund eines Adenokarzinom des Magens in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) operativ versorgt wurden. Von einem Teil des Patientenkollektivs, das sich der chirurgischen Behandlung von 1995-2006 unterzog, lagen bereits fertige TMAs vor, die nach gleicher und folgend dargestellter Methode angefertigt wurden. Sie wurden zu einem früheren Zeitpunkt von Mitarbeitern des chirurgischen Forschungslabors der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie hergestellt und uns für die Untersuchung zur Verfügung gestellt. Das Patientenmaterial von 2007-2013 wurde im Rahmen dieser Studie zusätzlich verwendet. Insgesamt lagen zu Beginn 216 Proben vor. Patienten bei denen nur ein unvollständiger Bericht vorlag, die sich einer präoperativen Chemotherapie oder Radiotherapie unterzogen, oder von denen nur inkomplettes beziehungsweise unzureichendes Patientenmaterial vorlag, wurden in die Studie nicht einbezogen. Bei der Überlebensanalyse wurden Patienten, die innerhalb der ersten 30 Tage nach Operation verstorben sind, deren Follow up nicht nachvollziehbar war, oder bei denen operativ keine R0 Situation durch die chirurgischen Behandlung zu erreichen war, ausgeschlossen. Die Gewebe des Untersuchungskollektivs bestanden aus Proben des primären Magenkarzinoms (Tumorzentrum und Invasionsfront), der korrespondierenden Normalmukosa des Magens und einer Probe einer Lymphknotenmetastase (wenn diese klinisch vorhanden war). Von zwölf Patienten lag nur ein unvollständiger Bericht vor. Bei drei weiteren Patienten ließ sich kein Tumor nachweisen. Es konnten daher 201 Patienten in die Studie aufgenommen werden. In die angeschlossene Überlebensanalyse konnten 154 Patienten eingebunden werden. Bei zehn Patienten war das Follow up nicht möglich. Bei 24 weiteren konnte keine R0 Situation erreicht werden und 14 Betroffene sind innerhalb der ersten 30 postoperativen Tage verstorben. Die Patientenselektion ist in Abbildung 5 zusammengefasst. Ein positives Ethikvotum zur Verwendung der Gewebeproben von Patienten der Ethikkommission der Uniklinik Düsseldorf mit den Studiennummer 2316 und 3821 lag vor.

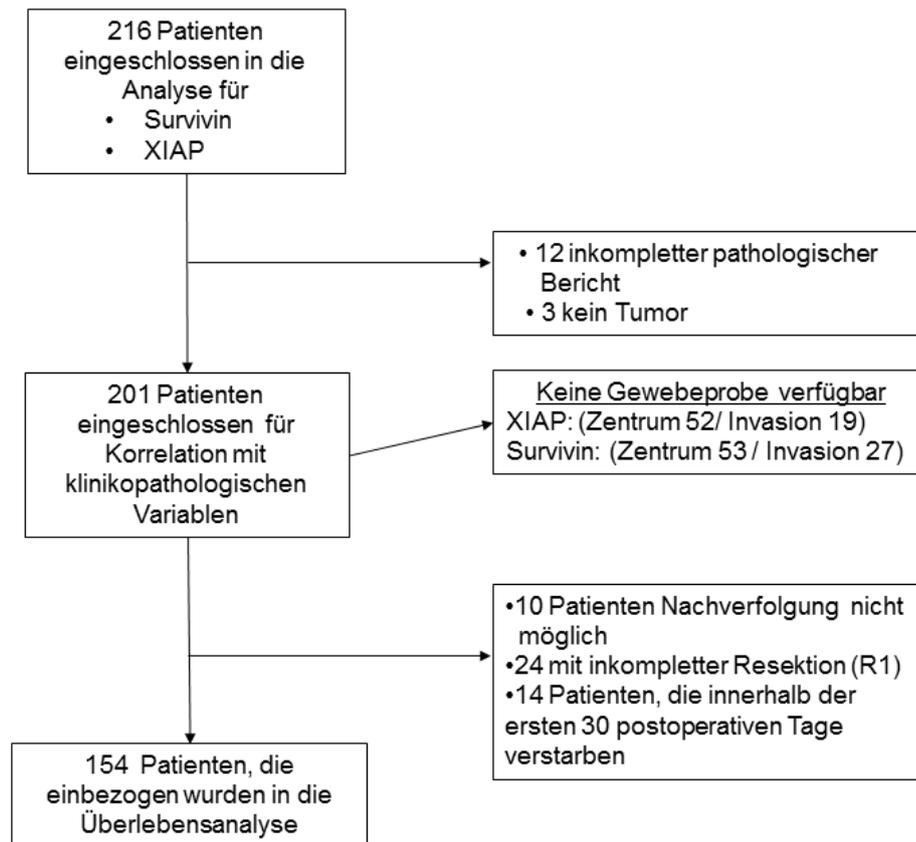


Abbildung 5: Patientenauswahl entsprechend der Einschlusskriterien

2.2.1 Klinische Variablen

Als klinisch-pathologische Variablen wurden das Alter, Geschlecht, Klassifikation nach Lauren, Ausbreitung des Primärtumors (T-Stadium), positiver beziehungsweise negativer Lymphknotenstatus, das Bestehen von Fernmetastasen, der Differenzierungsgrad, das UICC Stadium und der Resektionsstatus den pathologischen Befunden und klinischen Berichten entnommen. Im Folgenden werden diese aufgeführt. Das Alter lag im Median bei 71 Jahren. Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Operation 26 Jahre und der älteste 91 Jahre alt. Die Untersuchung bezog 65 männliche (32.3 %) und 136 weibliche (67.7 %) Patienten ein. Es wurden 78 diffuse (38.8 %), 76 intestinale (37.8 %) und 47 gemischte (23.4 %) histologische Typen entsprechend der Klassifikation nach Lauren ermittelt. Für die nachfolgenden Untersuchungen zur Ausbreitung des Primärtumors wurden die Stadien T1 und T2 (124; 61.7 %) als niedriges Stadium, sowie T3 und T4 (77; 38.3 %) als fortgeschrittenes Stadium zusammengefasst. Bei 56 Patienten (27.9 %) konnten nach chirurgischer Therapie am Resektat keine Lymphknotenmetastasen (N0), bei 145 Patienten (72.1 %) Lymphknotenmetastasen (N1+) nachgewiesen werden. 182 (90.5 %) Patienten hatten keine Fernmetastasen und 19 (9.5 %) wiesen Fernmetastasen auf. Zur statistischen Analyse wurden die Differenzierungs-

grade G1 und G2 (45; 22.4 %) beziehungsweise G3 und G4 (156; 77.6 %) zusammengefasst. Durch die chirurgische Resektion konnte bei 177 (88.1%) Patienten eine R0 Situation erreicht werden, bei 24 (11.9 %) Patienten war eine vollständige Resektion nicht möglich (R1). 98 (48.8 %) der Patienten befanden sich in einem niedrigen UICC Stadium(UICC I-II) und 103 (51.2 %) in einem fortgeschrittenen UICC Stadium (UICC III-IV). Eine Zusammenfassung der klinikopathologischen Daten bietet Tabelle 11.

Tabelle 11: Klinikopathologische Charakteristika des Patientenkollektivs

Variablen	Patienten in (%)
Total	201 (100.00)
Alter	
Median (Bereich)	71 (26-91) Jahre
Geschlecht	
Männlich	65 (32.3)
Weiblich	136 (67.7)
Lauren Klassifikation	
Intestinaler Typ	76 (37.8)
diffuse Typ	78 (38.8)
Gemischter Typ	47 (23.4)
Tumorstadium	
T1/2	124 (61.7)
T3/4	77 (38.3)
Lymphknotenmetastase	
N0	56 (27.9)
N1+	145 (72.1)
Fernmetastasen	
M0	182 (90.5)
M1	19 (9.5)
Grading	
G1/2	45 (22.4)
G3/4	156 (77.6)
UICC Stadium	
UICC I/II	98 (48.8)
UICC III/IV	103 (51.2)
Resektionsstatus	
R0	177 (88.1)
R1	24 (11.9)

2.3 Methoden

2.3.1 Der Tissue Microarray

Die Tissue Microarray (TMA) Technik wurde von Battifora et al 1986 entwickelt und von Kononen et al weiter spezifiziert.^{186,187} Sie ermöglicht Paraffin-eingebettetes Patientengewebe verschiedener Herkunft in einen ganz neuen Paraffinblock einzubringen und diesen weiterzuverarbeiten. Durch die Weiterentwicklung der TMA-Herstellung ist es heutzutage möglich bis zu 1000 Gewebeproben auf einen Objektträger aufzubringen und deren immunhistochemischen Eigenschaften unter identischen Voraussetzungen zu untersuchen.¹⁸⁶ Ein großer Vorteil dieser Methode ist, dass man nur wenig Ursprungsgewebe des Spenderblocks benötigt und dieses bei Entnahme nur geringfügig beschädigt wird.¹⁸⁸ Die TMA-Technik ermöglicht so die Detektion von Biomarkern in Malignomen an in Serie geordneten Gewebeproben bei gleicher Färbequalität. Zusätzlich erlaubt sie, die Analyse großer Patientenzahlen dadurch, dass eine größere Anzahl von Proben auf einem Objektträger aufgetragen werden kann. Das ermöglicht die Untersuchung von größeren Anzahlen an Gewebeproben, wodurch die Erlangung validerer Ergebnisse ermöglicht wird, als es zum Vergleich bei der klassischen Immunhistochemie der Fall ist.¹⁸⁹ Um die Expression von Survivin und XIAP zu untersuchen wurden TMAs angefertigt. Dazu wurden für die Untersuchungsgruppe 201 Formalinfixierte, Paraffin-eingebettete Tumorgewebeproben und das zum Patienten gehörende Normalgewebe, sowie ein befallener Lymphknoten verwendet, falls dieser vorhanden war. Dazu wurde aus einem Tumorgewebe-/Normalgewebepblock (Donorblock) eine Gewebeprobe entnommen und auf einen freien Paraffinblock (Rezipientblock) übertragen. Dies wurde mit der gewünschten Anzahl an Proben wiederholt und die TMAs, wie folgend detailliert beschrieben, hergestellt.

2.3.2 Herstellung der TMAs

2.3.2.1 Gewebeprobenauswahl

Zunächst erfolgte die Selektion der Patienten mit einem primären Magenkarzinom aus dem Kollektiv der Patienten, die sich von 2006 bis 2013 einer chirurgischen Resektion am UKD unterzogen hatten. Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbte Schnitte von diesem Kollektiv wurden aus dem Pathologiearchiv des UKDs herausgesucht und auf das Vorhandensein von Tumorgewebe, Tumorgewebe der Invasionsfront und auf Normalgewebe lichtmikroskopisch überprüft. Falls Lymphknoten-Metastasen vorhanden waren beziehungsweise ein Lymphknotenbefall vorlag, wurde dieser ebenfalls lichtmikroskopisch untersucht. Primäres Tumorgewebe, primäre Invasionsfront des Tumors, Normalgewebe und eventuelle LK-Metastase wurden entsprechend auf dem HE-Schnitt markiert. Die lichtmikroskopische Untersuchung und Markierung der Proben wurde von einer Pathologin (Frau Dr. JR., Pathologie UKD) durchgeführt. Das Patientenkollektiv von 1995-2006 wurde auf gleiche Weise zusammengestellt. Dies geschah zu einem früheren Zeitpunkt durch Mitarbeiter des chirurgischen Forschungslabors der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie und der Pathologie des UKDs. Diese Proben wurden für die Studie zur Verfügung gestellt.

2.3.2.2 Technische Herstellung TMA

Die Technische Herstellung des TMAs wurde mit einem manuellen Stanzgerät vorgenommen (Abb. 6). Als erstes wurde der Rezipientblock in die vorgesehene Halterung des Stanzgerätes eingespannt. In diesen Paraffinblock wurde mit Hilfe einer Stanze ein 4 mm tiefes zylinderförmiges, 1,0 mm durchmessendes Loch gestanzt, das als Einbettungslager für das Donormaterial diente. Aus dem Donorblock wurde ebenfalls ein zylinderförmiges Gewebestück mit den gleichen Maßen entnommen. Dies geschah an der zuvor markierten Stellen der untersuchten HE-Schnitte, indem man diese vor der Entnahme auf den Donorblock auflegte und die Entnahmestanze entsprechend positionierte. Die Entnahmestanze wurde samt Gewebeinhalt über dem zuvor ausgestanzten Loch positioniert. Das in der Stanze befindliche Gewebe wurde mit Hilfe eines vorhandenen Stempels an der Stanze in den Rezipientblock überführt. Mit einer an dem Stanzgerät angebrachten elektronischen Messhilfe wurde ein Abstand von 1,5 mm eingestellt und der Prozess an neuer Position nach gleichem Schema wiederholt (Abb. 7).

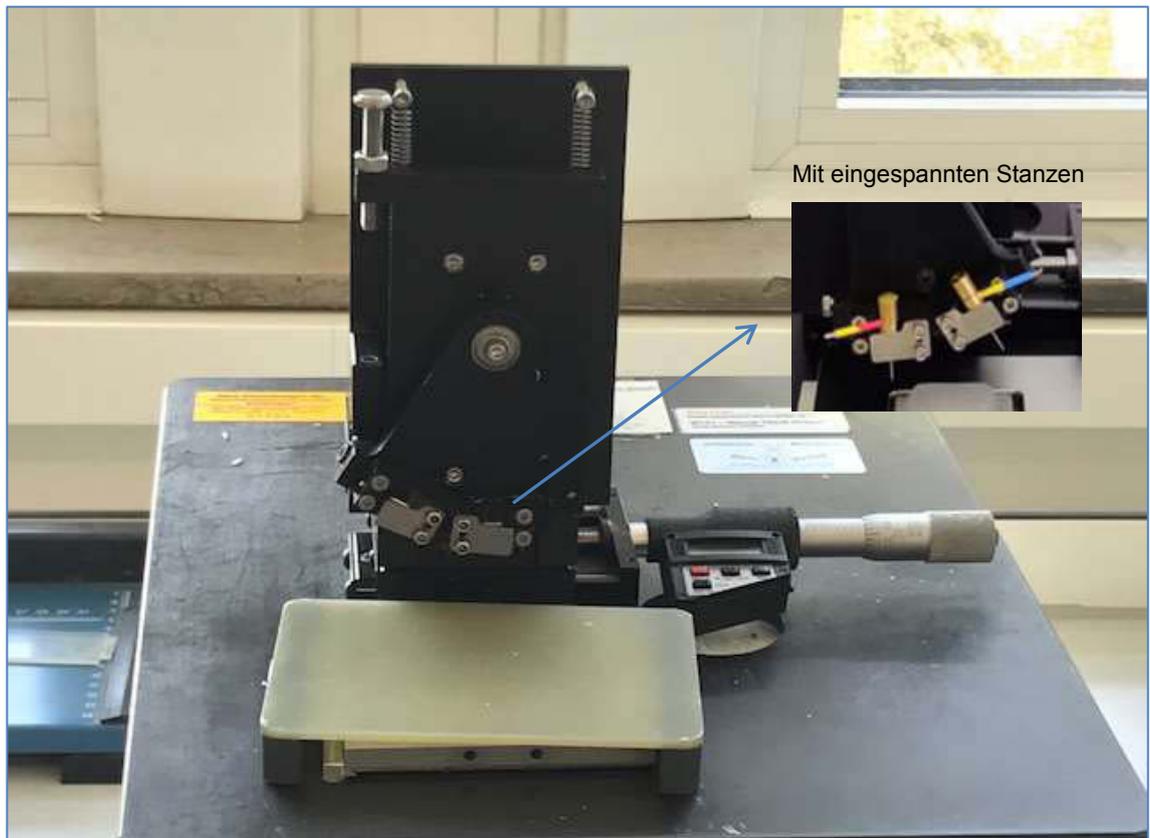


Abbildung 6: Manual Tissue Arrayer

Mit der linken Stanze (rot) wird in den Rezipientenblock zunächst ein zylinderförmiges Loch gestanzt. Das gleiche Procedere erfolgt im Donorblock mit der rechten Stanze (blau) Nach entsprechender Gewinnung von Tumorgewebe wird der Inhalt der Stanzen in das zuvor ausgestanzte Loch des Rezipientenparaffinblocks überführt.

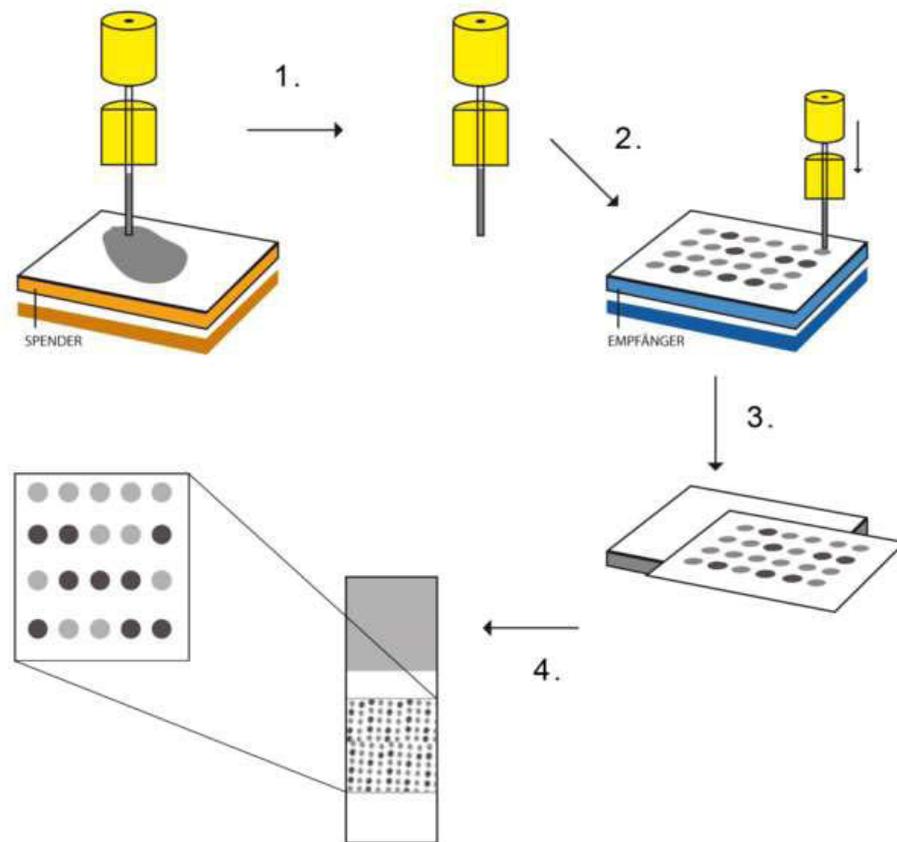


Abbildung 7: Herstellung eines TissueMicroarray

1. Entnahme der Gewebebiopsie aus dem Spenderblock. 2. Transferieren des Gewebezyllinders in den Empfängerblock. 3. Schnitt des angefertigten Blocks mittels Mikrotom. 4. Aufziehen des Schnitts auf einen Objektträger.

Eine Patientenreihe bestand jeweils aus zwei Proben des Tumorzentrums, zwei Proben der Invasionsfront des Tumors, einer Normalgewebeprobe und falls vorhanden aus einer Stanze aus einer Lymphknotenmetastase. Zwischen den jeweiligen Gewebeproben wurde immer ein Abstand von 1,5 mm eingehalten. In einer Reihe konnte das Material von zwei Probanden untergebracht werden, dabei wurde ein Abstand von 3 mm zwischen diesen eingehalten. Zur darunter folgenden Reihe konnte ebenfalls ein Abstand von 1,5 mm eingehalten werden. Zusätzlich wurde in den ersten vier Reihen eine elfte Spalte in der rechten Ecke mit Kontrollgewebe, das gleichzeitig der Orientierung diente, eingefügt. In den ersten beiden Reihen bestand dieses aus Muskelgewebe und in der dritten und vierten Reihe aus Tonsillengewebe. Bei dem zuvor entstandenen Kollektiv wurde auf gleicher Position anstatt Muskelgewebe Colongewebe zur Kontrolle gewählt. Der Abstand zum Vorgewebe betrug auch hier 1,5 mm. Auf dem Empfängerblock konnten auf diese Weise die Proben von insgesamt 20 bzw. 19 Patienten eingebettet werden, was zusätzlich den direkten Vergleich ermöglichte. Der ausgefüllte

Empfängerblock wurde anschließend noch für 30 Minuten bei 60 Grad eingeschmolzen damit sich das Gewebe mit dem Paraffin verbinden konnte. Insgesamt wurden auf diese Weise mit Gewebeproben von 216 Patienten 11 TMA Paraffinblöcke hergestellt. Für die Immunhistochemie wurden mittels eines Mikrotoms 2µm Schnitte aus den Paraffinblöcken angefertigt und nachfolgend auf Superfrost Objektträger aus Glas übertragen. Dieser stand dann zum Färbeprozess beziehungsweise für die immunhistochemische Verarbeitung zur Verfügung. Die Ansicht eines fertigen HE-Schnitts nach immunhistochemischer Färbung beziehungsweise fertigen TMA bietet Abbildung 8.

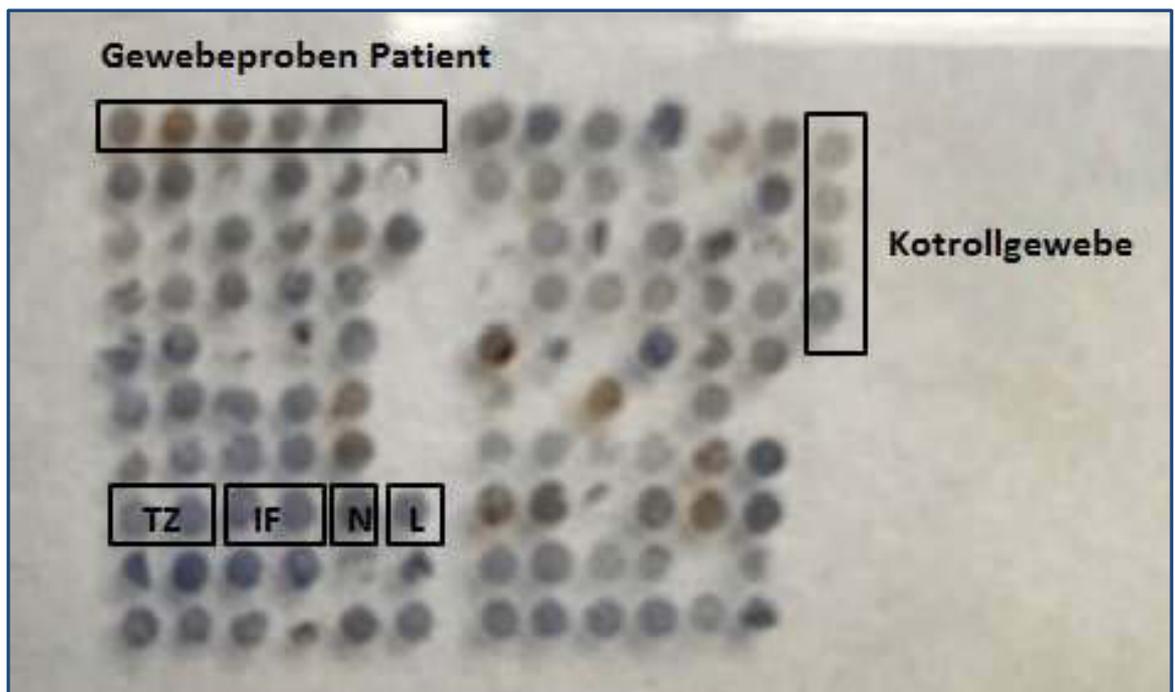


Abbildung 8: HE- gefärbter TMA Schnitt nach immunhistochemischer Behandlung mit entsprechender Anordnung

Legende: TZ=Tumorzentrum (2 Proben), IF=Invasionsfront (2 Proben),
N=Normalgewebe (1 Probe), L=LK-Metastase (1 Probe)

2.3.3 Immunhistochemie an den TMAs

Die Untersuchung der Expression wurde anhand der Empfehlungen für Tumormarker prognostische Studien vorgenommen.¹⁹⁰

Die Immunhistochemie ist zum Nachweis von Proteinen geeignet. Sie dient vor allem in der Medizin und Biologie als Detektionstechnik und ihre Anwendung ist besonders in der Tumordiagnostik und Prognose von großer Bedeutung.¹⁹¹ Der Nachweis durch die Immunhistochemie gelingt nach dem Prinzip der Antigen-Antikörper Reaktion, bei der man drei Methoden unterscheiden kann. Bei der direkten Methode wird das gesuchte Antigen durch die Inkubation mit einem Primärantikörper, an dem ein Farbstoff gekoppelt ist, nachgewiesen. Bei der indirekten Methode wird der gebundene Primärantikörper, der gegen das Antigen gerichtet ist, mit Hilfe eines Sekundärantikörpers, an dem ein Farbstoffkomplex gebunden ist, detektiert. Bei der Enzym-Immunglobulin-Komplex-Methode fungiert der an den Primärantikörper gebundene Sekundärantikörper als Brückenantikörper. An diesen bindet ein weiterer Antikörper, der mit einem Enzym versetzt ist, gegen das er auch gleichzeitig gerichtet ist und als löslicher Komplex vorliegt (z. B. Peroxidase). Dieser kann dann histochemisch visualisiert werden.²² Die von uns verwendete Technik nach der Streptavidin-Biotin Komplexmethode entspricht dem indirekten Verfahren.

2.3.3.1 Die Streptavidin-Biotin Komplexmethode (ABC-Methode)

Für den Nachweis der Proteine Survivin und XIAP wurde die Färbung nach der Streptavidin-Biotin Technik durchgeführt. Streptavidin wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert. Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, das als Marker an einem Sekundärantikörper (biotinylierter Antikörper) fungiert und an diesen gekoppelt ist.¹⁹² Bei der von uns verwendeten Methode kann ein biotinylierter Sekundärantikörper mehrere Moleküle eines Konjugats aus Meerrettich-Peroxidase binden. Nach der Inkubation des TMAs mit dem Primärantikörper bindet dieser idealerweise an das Zielantigen. Danach wird der Sekundärantikörper aufgetragen und schließlich das Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat hinzugegeben, das an den Biotinrest des Sekundärantikörpers bindet. Durch die Zugabe einer Substrat-/ Chromogenlösung beginnt eine enzymatische Reaktion mit der gebundenen Peroxidase. Diese oxidiert das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) am Ort des Zielantigens und es bildet sich idealerweise ein dunkelbrauner Farbniederschlag als Reaktionsprodukt (Abb. 9) Es handelt sich hierbei um ein mehrstufiges Detektionssystem, das auch bei geringer Expression des Zielantigens den Nachweis möglich macht.

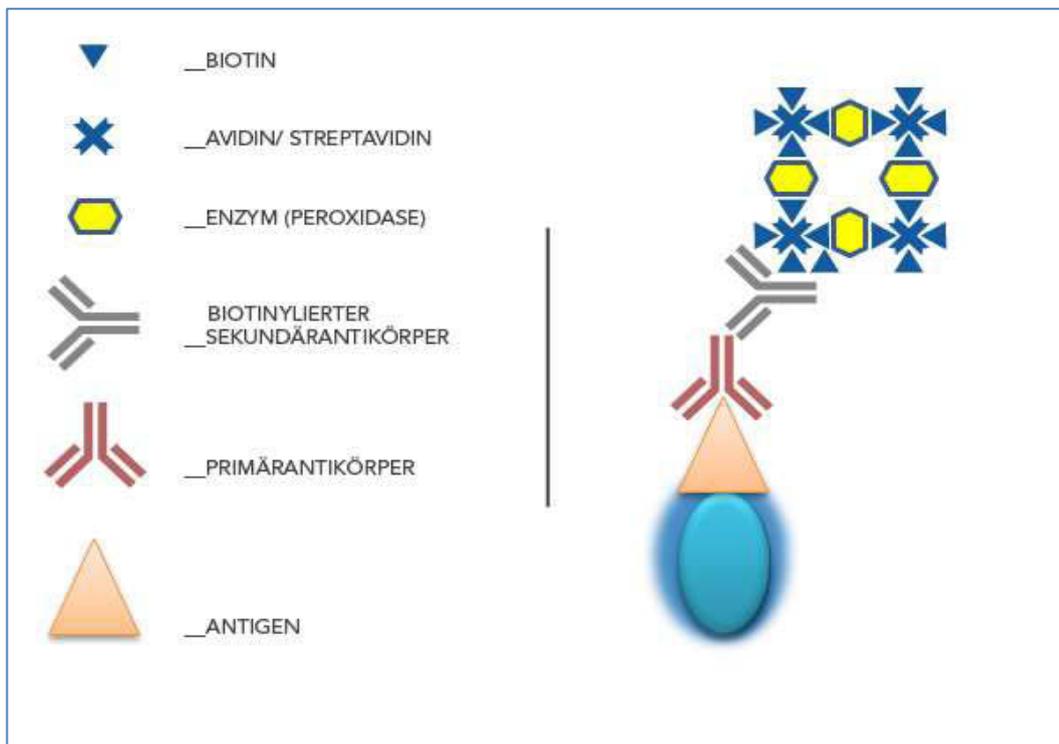


Abbildung 9: Prinzip der (Streptavidin-) ABC-Methode

Der Primärantikörper bindet an das Antigen. Der biotinylierte Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper. An das Biotin des Sekundärantikörpers bindet der Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von DAB

2.3.3.2 Vorgang bei der Immunhistochemie

Als Erstes wurden die in Paraffin eingebetteten Gewebe mit Xylol durch zweimalige zehninminütige Waschungen deparaffinisiert. Für eine Rehydratisierung wurden die Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe (99,5 %, 96 %, 80 %) je zweimal zwei Minuten und einmal zwei Minuten mit 70% Ethanol gewaschen und darauf folgend fünf Minuten mit destilliertem H₂O inkubiert. Als nächstes folgte die Demaskierung, somit die Wiederherstellung der Immunreaktivität von Geweben. Hierfür wurden die Präparate in der Retrieval Solution (Trinatriumcitratdihydratlösung mit dem pH 6) inkubiert und in der Mikrowelle bei 1000 Watt für 30 Minuten erhitzt. Danach wurden die Schnitte in dieser Lösung für eine Verweildauer von 20 Minuten belassen, um bei Raumtemperatur abkühlen zu können. Es folgte eine fünfminütige Inkubation mit einer PBS/0,1% Tween20 Lösung. Danach wurden die Objektträger abgetrocknet und die Schnitte mit Super Pap Pen Mini Fettstift umrandet, um so die Ausbreitung von Blocking- und Antikörperlösung über den Geweberand hinaus zu vermeiden. Für die folgende Inhibition der endogenen Peroxidase-Aktivität wurden die Schnitte jeweils mit 150µl 3,0 % H₂O₂ in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss folgte dreimal eine zweiminütige Waschung mit einer PBS/ 0,1 % Tween20 Lösung. Folgend wurden die Schnitte mit Blocking Solution/Reagenz 1 fünf Minuten behandelt. Dies geschah um eventuelle unerwünschte Hintergrundfärbungen zu vermeiden, die durch unspezifische Bindung des Primärantikörpers oder Sekundärantikörpers entstehen konnten. Ein erneutes zweiminütiges Waschen mit Waschpuffer (PBS+0,1 % Tween20) erfolgte. Durch diese Vorbereitungen war nun das Auftragen, des in unserem Labor bereits ausgetesteten Primärantikörpers und der Negativ-Kontrollen, die vorher mit Antibodydi-
luent nach Vorgabe des Herstellers verdünnt wurden, möglich. Jeder Schnitt wurde mit 150µl verdünnter Antikörperlösung 30-60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dem folgte wiederum dreimal eine zweiminütige Waschung mit Waschpuffer (PBS+ 0,1 % Tween20). Nach dieser Vorbereitung konnte die Behandlung der Schnitte mit dem ZytoChem HRP Kit, das nach dem Streptavidin-Biotin-Prinzip arbeitet, angeschlossen werden. Dazu wurden die Schnitte jeweils mit 1-2 Tropfen pro Präparat mit dem Sekundärantikörper (Biotinnylated Secondary Antibody, polyvalent, Reagenz 2) für 10-15 Minuten inkubiert. Ein erneuter dreimaliger Waschprozess für zwei Minuten mit PBS+0,1 % Tween20 folgte. Anschließend wurde das Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (Reagenz 3), von dem jeweils 1-2 Tropfen pro Präparat aufgetragen wurden, für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf den Schnitten belassen. Dem folgte wiederum ein dreimaliges, jeweils zweiminütiges Waschen. Danach wurden die Präparate jeweils mit 1-2 Tropfen der Substrat/Chromogenlösung (DAB Substrat/Enzymkonjugat) für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert. Eine enzymatische Reaktion mit der Peroxidase bei geschlossenem Deckel in

der Färbekammer startete. Als Reaktionsprodukt wurde eine Farbniederschlag an der Bindungsstelle zwischen Primärantikörpers und Sekundärantikörpers ersichtlich. Die Visualisierung war durch das Lichtmikroskop möglich, wie gleichzeitig auch die Kontrolle der Farbintensität. Als die gewünschte Farbintensität erreicht war, wurde die Reaktion durch eine fünfminütige Waschung mit destilliertem H₂O beendet. Hiernach wurden die Schnitte mit Meyers Hämalaun, das der Kernfärbung diente, 15 Sekunden eigenfärbt. Anschließend wurden die Schnitte 15 Minuten gewässert und kurz in destilliertes H₂O gestellt. Eine erneute Waschung in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 80 %, 99 %) für jeweils eine Minute und in Xylol für zwei Minuten wurde angeschlossen. Als letzter Schritt folgte das Eindecken der Schnitte mit Entellan/Corbit Lösung und Deckgläschen unter dem Abzug, wo diese auch zum Ruhen über Nacht belassen wurden.

2.3.4 Die Antikörper

Für die immunhistochemische Analyse von XIAP wurde ein muriner, monoklonaler Anti-XIAP-Antikörper verwendet (Clone 48; 1:50 Verdünnung, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Für die Detektion von Survivin wurde ein polyklonaler Anti-Survivin-Antikörper, vom Hasen abstammend, genutzt (NB-500-201; 1:1000 Verdünnung, Novus, Littleton, CO, USA). Für die Negativ-Kontrollen wurde ein murines IgG1 kappa (MOPC-21, abcam, Cambridge UK) und eine vom Hasen abstammende Immunglobulin Fraktion (Code X093, Dako, Glostrup, Denmark) verwendet.

2.3.5 Auswertung der Immunhistochemie

Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgte durch zwei unabhängige, geblindete Untersucher (Dr. med. Levent Dizdar und Monika Tomczak), mit Hilfe des von Remmele und Stegner beschriebenen Immunoreaktiven Scores (IRS).¹⁹³ Bei divergenten Ergebnissen wurden die TMAs parallel evaluiert. Dazu wurde der repräsentative Gewebeschnitt unter dem Lichtmikroskop in 400-facher Vergrößerung betrachtet. Mit Hilfe der mikroskopischen Untersuchung bestimmte man den Prozentsatz an positiv gefärbten Zellen (PP-Score= percentage points) und zur Schätzung der Färbeintensität den SI-Score (SI=staining intensity). Der PP-Score konnte dabei Werte von 0-4 erreichen, die sich aus den jeweiligen Prozentsätzen des gefärbten tumorösen Gewebes ergaben (Tabelle 12).

Tabelle 12: Einteilung PP-Score

0	keine positiv gefärbten Zellen
1	1-10 % positiv gefärbten Zellen
2	11-50 % positiv gefärbten Zellen
3	51-80 % positiv gefärbten Zellen
4	81-100% positive gefärbten Zellen

Die SI-Werte konnten im Bereich von 0-3 liegen. Durch diese wurde die Farbintensität skaliert. Die Werte definierten dabei bestimmte Intensitäten, die Tabelle 13. zu entnehmen sind.

Tabelle 13: Eiteilung SI-Score

0	Keine Färbung (-)
1	Schwache Färbung (+)
2	Mäßige Färbung (++)
3	Starke Färbung (+++)

Der IRS ergab sich schließlich aus der Multiplikation des PP-Scores und korrespondierenden SI-Scores ($IRS = PP \times SI$). Dieser konnte dadurch Werte zwischen 0 und 12 erreichen (Tabelle 14).

Tabelle 14: IRS- Werte

Farbintensität Prozentsatz positiver Zellkerne	Keine Farbreaktion = 0 Punkte	Schwache Farbreaktion = 1 Punkt	Mäßige Farbreaktion = 2 Punkte	Starke Farbreaktion = 3 Punkte
Keien positiven Zellkere = 0 Punkte	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
<10 % positive Zelkerne = 1 Punkt	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
10-15% positive Zellkerne = 2 Punkte	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
51-80% positive Zelkerne = 3 Punkte	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
>80% positive Zellkerne= 4 Punkte	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

Legende: IRS=Immunoreaktive Score ¹⁹⁴

Für Überlebensanalysen und zum Vergleich der Expressionslevel in Abhängigkeit der jeweiligen klinisch-pathologischen Variablen wurde der mediane IRS für nukleäres und zytoplasmatisches Survivin sowie für XIAP in Gruppen mit hoher (> Median IRS = IRS > 2) oder niedriger (\leq Median IRS = IRS \leq 2) Survivin- und XIAP-Expression eingeteilt. Dieser homogene Cut-off-Wert unterteilte unser Kollektiv in zwei ungefähr gleich große Gruppen für beide IAPs, Survivin und XIAP.

2.3.6 Statistische Analyse

Wenn beide Gewebeproben eines Kompartiments vorhanden und vollständig zu beurteilen waren, wurden die Mittelwerte der IRS Ausprägung von Survivin und XIAP für das Tumorzentrum und Invasionsfront berechnet. Falls dies nicht der Fall war, wurde nur der Wert der vorhandenen Gewebeprobe zu Berechnung genutzt. Für das Lymphknoten-/und Normalgewebe gab es wie bereits erwähnt jeweils eine Probe, die zu statistischen Analyse genutzt wurde. Diese musste ebenfalls vorhanden bzw. vollständig sein. Die Variation der IAP Expression im Tumorzentrums und der Invasionsfront wurde mit dem Wilcoxon matched pairs Test oder dem Mann-Whitney U Test vorgenommen. Zur Analyse der Korrelationen zwischen XIAP und Survivin Ausprägung diente die Spearman Korrelation.

Für weiterführende Analysen wurden die IAP Expressionen in zwei Gruppen geteilt, in eine Gruppe mit hoher ($>$ Median IRS = IRS $>$ 2) oder niedriger (\leq Median IRS = IRS \leq 2) Survivin- oder XIAP-Expression. Die hier dargestellte Kategorisierung dient der zusätzlichen Veranschaulichung: Geschlecht: männlich vs. weiblich; Alter: \geq Median vs. $<$ Median; Lauren Klassifikation: intestinaler Typ vs. gemischter und diffuser Typ; Tumorstadium: T1/2 vs. T3/4; Lymphknotenmetastasen: N0 vs. N1+; Fernmetastasen: M0 vs. M1; Differenzierungsgrad: G1/2 vs. G3/4; UICC- Stadium: UICC I/II vs. UICC III/IV; Resektionsstatus: R0 vs. R1. Die Korrelationen zwischen diesen Variablen und der jeweiligen IAP Expressionsintensität wurde mit dem Fischer's exact Test untersucht. Für die Überlebensanalyse wurde der Zeitraum ab dem Zeitpunkt der chirurgischen Resektion bis zum Versterben, oder bis zum letzten Follow up, als Überlebenszeit bestimmt. Als Ausschlusskriterien für die Überlebensanalyse galten das Versterben innerhalb der ersten 30 postoperativen Tage und ein R1 Resektionszustand. Die univariaten Überlebensanalysen wurden mit dem Kaplan-Meier-Schätzer erstellt und zur Beurteilung der Mantel Cox long-rank Test benutzt. Hierfür wurden Hazard Ratios mit einem 95 % Konfidenzintervall berechnet. Multiple Regressionsanalysen wurden mit der proportionalen Hazard Cox's Regression erstellt. Für die Auswahl der Variablen wurde das Akaike Informationskriterium (AIC) herangezogen und das das Modell mit dem niedrigsten AIC als besser zu den Daten passend betrachtet. Die statistischen Analysen wurden mit GraphPad Prism für Windows (Version 5, Graph Pad Software, San Diego, California USA), SPSS statistic für Windows (Version 17.0, Chicago: SPSS Inc.) und mit der R statistical software, Version 3.2.2, durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $<$ 0,05 definiert.

3. Ergebnisse

3.1 Patienten und Ergebnisse

201 Patientenproben wurden immunhistochemisch auf ihre Survivin und XIAP Expression untersucht. In die Überlebensanalyse konnten 154 Patienten mit einer mittleren Nachbeobachtungszeit von 23,5 Monaten (Bereich 1-120 Monate) und einer mittleren Gesamtüberlebenszeit von 29,8 Monaten eingeschlossen werden. 24 Patienten, mit unvollständiger Resektion (R1), 14 Patienten, die innerhalb 30 Tagen nach Operation verstorben sind und 9 Patienten deren Nachverfolgung nicht möglich war, wurden aus der Überlebensanalyse ausgeschlossen.

3.2 Survivin und XIAP Expression im Magenkarzinom

Die immunhistochemische Färbung ermöglichte die Verifizierung der Expression von Survivin im Zytoplasma und im Kern (Abb. 10). XIAP ließ sich hingegen nur im Zytoplasma darstellen (Abb. 10). Bezüglich der Färbintensität im Tumorzentrum, in der Invasionsfront, in der Lymphknotenmetastase und in der angrenzenden Normalmukosa konnte gezeigt werden, dass Survivin und XIAP beide in tumorösen Bereichen signifikant stärker exprimiert waren, als vergleichsweise in der Normalmukosa (Abb. 11 und 12). Erwähnenswert ist auch, die signifikant erhöhte Expression von XIAP in den Lymphknotenmetastasen (Abb. 11). Im Vergleich von Tumorzentrum zur Tumorinvasionsfront ließ sich kein evidenter Intensitätsunterschied der Survivin und XIAP Expression nachweisen (Abb. 11). Insbesondere fiel auf, dass die zytoplasmatische Survivin Expression positiv mit der XIAP Expression in den unterschiedlichen Tumorabschnitten korrelierte (Zentrum: $p = 0.009$; Invasionsfront: $p = 0.001$; Lymphknotenmetastase: $p = 0.047$; Abb. 13).

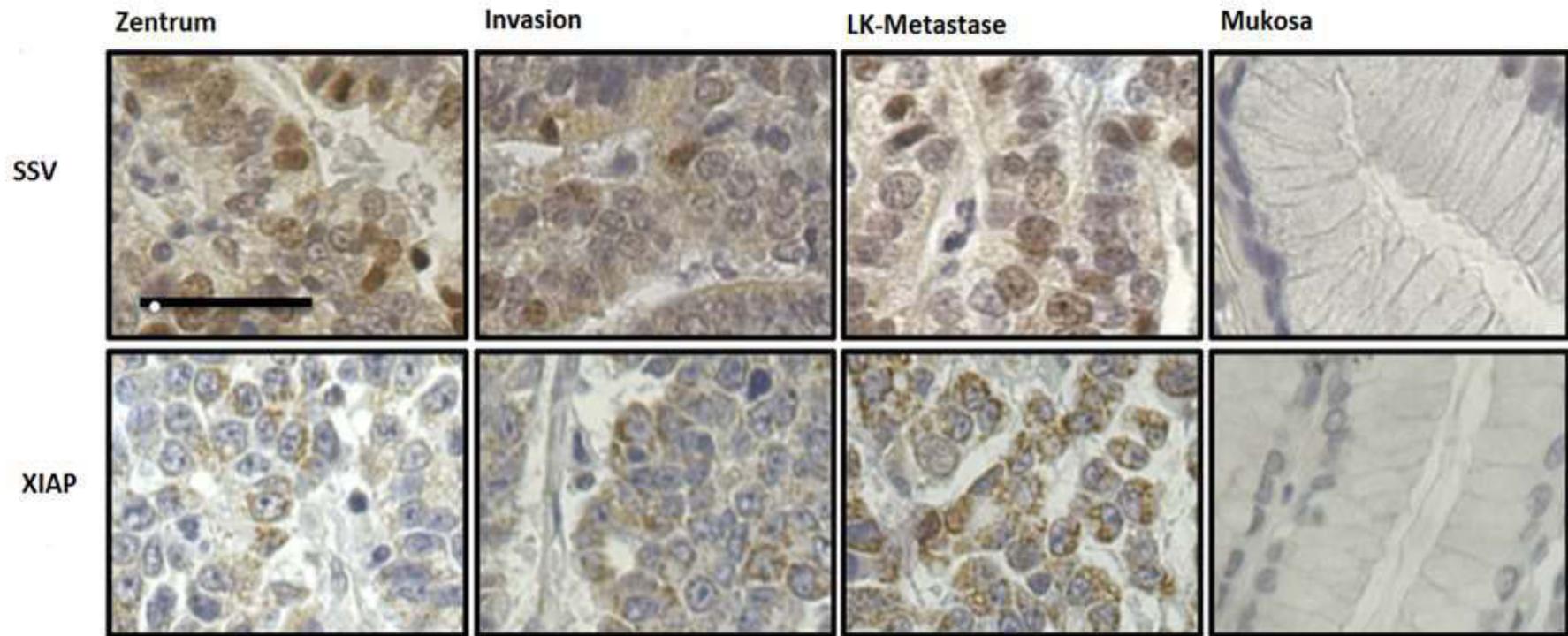


Abbildung 10: Beispiele immunhistochemische Färbung SSV und X-linked inhibitor of apoptosis

Legende: SSV= Survivin; XIAP= X-linked inhibitor of apoptosis protein; LK= Lymphknoten; dargestellt sind Magenkarzinomgewebe aus den jeweils analysierten Bereichen Tumorzentrum, Invasionsfront, Lymphknotenmetastase und zum Vergleich die dazugehörige Normalmukosa von einem Patienten. Die Bilder wurden in einer 400- fachen Vergrößerung aufgenommen. Ein Balken der Skala steht für 25 µm

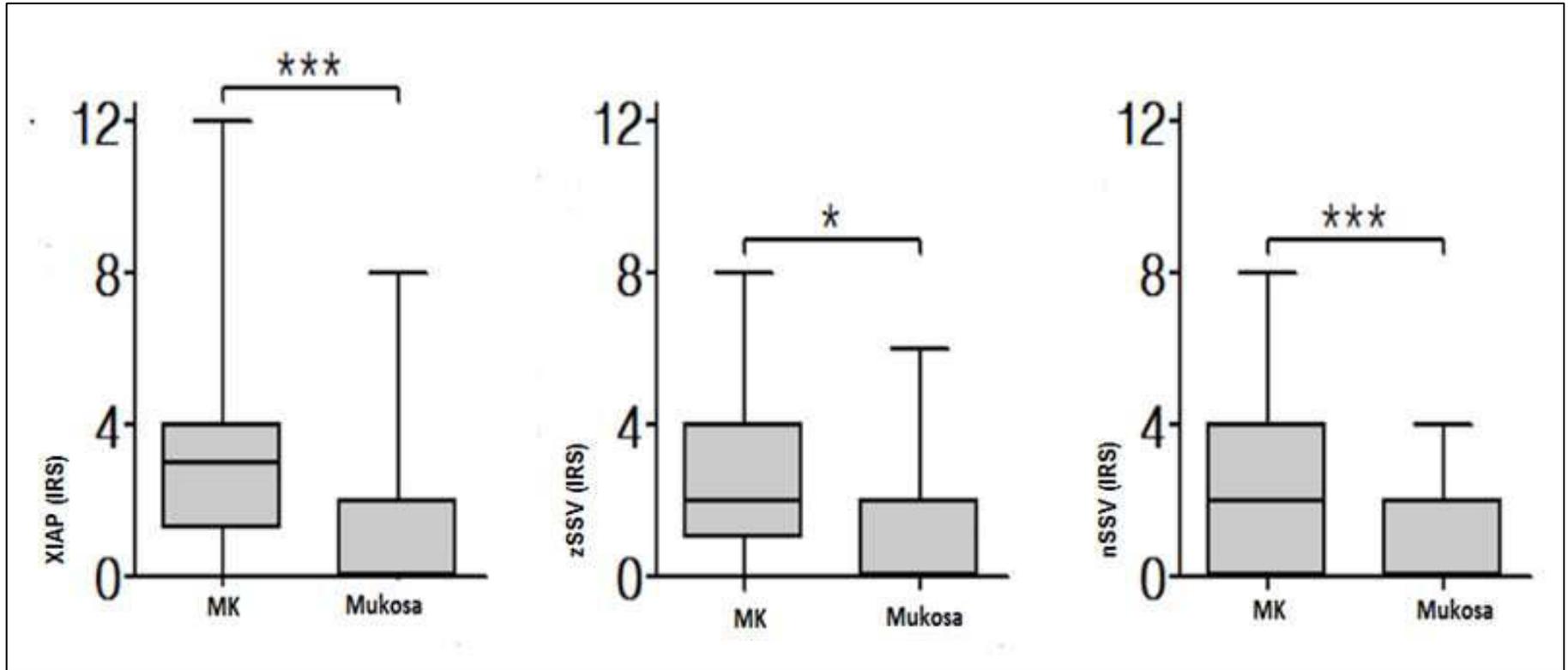


Abbildung 11: XIAP und Survivin (SSV) Expression

Legende: SSV= Survivin; XIAP= X-linked inhibitor of apoptosis protein: z= zytosolisch; n=nukleär; IRS= Immunreaktiver Score; MK= Magenkarzinom. Zu erkennen ist eine signifikante Erhöhung der XIAP und Survivin (SSV) Expression im Magenkarzinomgewebe im Vergleich zur nicht tumorösen Normalmukosa. Die Daten wurden durch einen two- tailed nonparametric Mann-Whitney U-Test untersucht (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$)

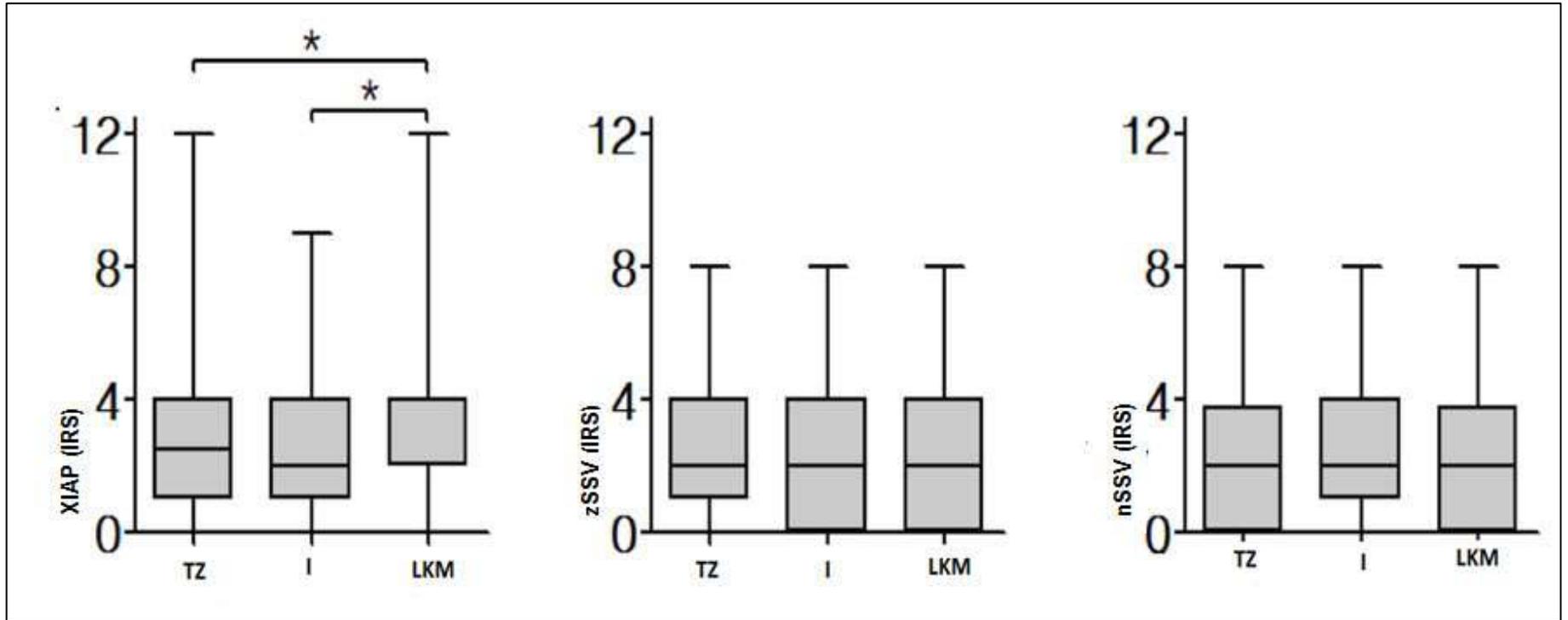


Abbildung 12: Boxplots der Ausprägung von Survivin (SSV) und XIAP

Legende: SSV= Survivin; XIAP= X-linked inhibitor of apoptosis protein: z= zytosolisch; n=nukleär; IRS= Immunreaktiver Score; TZ= Tumorzentrum; I= Invasion; LKM= Lymphknotenmetastase. Die Boxplots zeigen die Ausprägung von Survivin (SSV) und XIAP in den verschiedenen Tumorkompartimenten Tumorzentrum, Invasionsfront und Lymphknotenmetastase des zugehörigen Tumors. Diese Daten wurden mit einem Wilcoxon matched pairs Test analysiert (* $p < 0.05$)

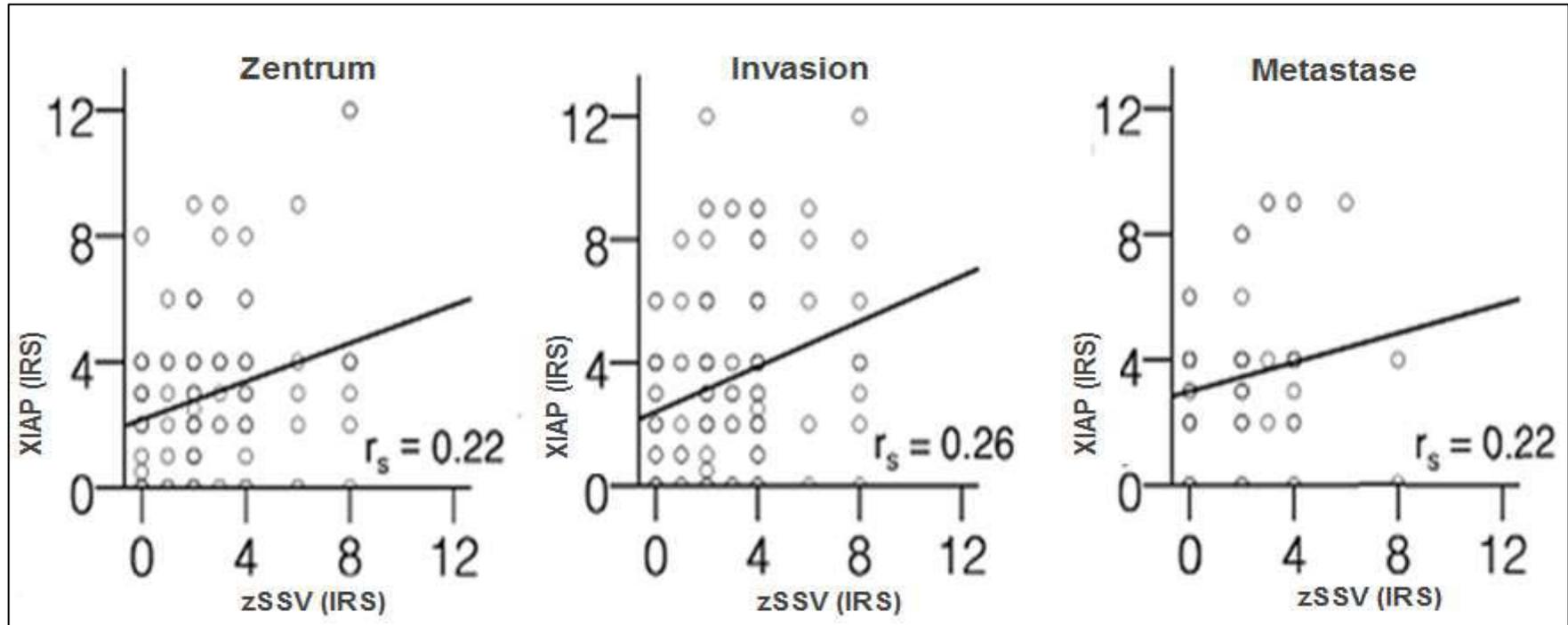


Abbildung 13: Korrelation zwischen XIAP und zytoplasmatischem Survivin

Legende: SSV= Survivin; XIAP= X-linked inhibitor of apoptosis protein: z= zytoplasmatisch; n=nukleär; IRS= Immunreaktiver Score; dargestellt ist die positive Korrelation zwischen XIAP und zytoplasmatischem Survivin in den verschiedenen Karzinomkompartimenten des Magenkarzinoms (Zentrum: $r_s = 0.219$, $p = 0.009$; Invasionsfront: $r_s = 0.257$, $p = 0.001$; Lymphknotenmetastase: $r_s = 0.218$, $p = 0.047$)

3.3 Korrelation zwischen Survivin und XIAP mit klinikopathologischen Faktoren

Die IRS Werte (als Maß für die Survivin/XIAP Ausprägung) wurden größer als 2 als hoch und kleiner beziehungsweise gleich zwei als niedrig definiert. Diese wurden dann mit klinikopathologischen Faktoren korreliert (Tabelle 15.1-15.3). Es konnte eine starke Korrelation zwischen der XIAP- und Survivin Ausprägung und der Klassifikation nach Lauren festgestellt werden. Sowohl Survivin als auch XIAP wiesen höhere Expressionsgrade beim intestinalen Typ auf wenn man sie mit dem diffusen Typ nach Lauren verglich (zytoplasmatisches Survivin: $p < 0.001$; nukleäres Survivin $p = 0.024$; XIAP: $p < 0.001$). Es stellte sich auch eine Signifikanz zwischen dem histopathologischen Grading und der Farbintensität heraus. Gut differenzierte Magenkarzinome wiesen eine höhere Expression von XIAP in beiden Primärtumorkompartimenten (Tumorzentrum und Invasionsfront) und für zytoplasmatisches Survivin im Tumorzentrum auf (zytoplasmatisches Survivin: $p = 0.019$; XIAP: $p = 0,001$). Die gleiche Tendenz ließ sich auch für frühe UICC Stadien feststellen. Auch hier konnte beobachtet werden, dass eine stärkere Expression für zytoplasmatisches Survivin und XIAP mit einem niedrigen UICC- Stadien assoziiert waren. Dies galt auch für Tumore, bei denen sich die Invasionsstiefe auf die Lamina muskularis propria beschränkte (zytoplasmatisches Survivin: $p = 0.020$; XIAP: $p = 0.005$). Bei kleineren Tumoren, ohne Lymphknotenmetastase oder Fernmetastase, ließ sich eine erhöhte Expression von zytoplasmatischen Survivin in der Invasionsfront nachweisen. Für das nukleäre Survivin konnte lediglich eine signifikant erhöhte Expression in der Invasionsfront von Tumoren, die von weiblichen Patientinnen stammen, festgestellt werden. Anderweitige Korrelationen zwischen der IAP Expression und Geschlecht wurden nicht festgestellt.

Tabelle 15.1: Korrelation klinikopathologische Faktoren mit Survivin und XIAP

	XIAP - Zentrum				Wert	XIAP – Invasion				Wert
	gering n=67		hoch n =82			gering n=88		hoch n=94		
Alter	n	%	n	%		n	%	n	%	
≤ Median	33	42.3	45	57.7		50	52.1	46	47.9	
> Median	34	47.9	37	52.1	0.514	38	44.2	48	55.8	0.302
Geschlecht										
männlich	17	38.6	27	61.4		25	43.9	32	56.1	
weiblich	50	47.6	55	52.4	0.369	63	50.4	62	49.6	0.429
Lauren										
diffus	34	59.6	23	40.4		38	57.6	28	42.4	
intestinal	15	25.4	44	74.6		24	33.3	48	66.7	
gemischt	18	54.5	15	45.5	< 0.001	26	59.1	18	40.9	0.005
Tumorstadium										
T1 / T2	28	35.4	51	64.6		47	42.3	64	57.7	
T3 / T4	39	55.7	31	44.3	0.014	41	57.7	30	42.3	0.049
LK Metastasen										
Negative, N0	10	30.3	23	69.7		19	38.0	31	62.0	
Positive, N+	57	49.1	59	50.9	0.074	69	52.3	63	47.7	0.098
Fernmetastasen										
M0	56	42.4	76	57.6		78	47.3	87	52.7	
M1	11	64.7	6	35.3	0.119	10	58.8	7	41.2	0.448
Grading										
G1 / G2	9	25.7	26	73.3		14	32.1	29	67.4	
G3 / G4	58	50.9	56	49.1	0.011	74	53.4	65	46.8	0.023
R-Status										
Negativ R0	55	42.0	76	58.0		79	58.4	84	51.5	
Positiv, R1	12	66.7	6	33.3	0.075	9	47.4	10	52.6	1.000
UICC										
I / II	20	32.8	41	67.2		33	38.4	53	61.6	
III / IV	47	53.4	41	46.6	0.019	55	57.3	41	42.7	0.012

Legende: XIAP= X-linked inhibitor of apoptosis protein; SSV= Survivin; zyt. = zytosolisch; nuk. = nukleär

Tabelle 15.2: Korrelation klinikopathologische Faktoren mit Survivin und XIAP

	SVV (zyt.) Zentrum				Wert	SVV (zyt.) – Invasion				Wert
	gering n=92		hoch n=56			gering n=100		hoch n=74		
Alter	n	%	n	%		n	%	n	%	
≤ Median	48	63.2	28	36.8		56	62.2	34	37.8	
> Median	44	61.1	28	38.9	0.866	44	52.4	40	47.6	0.221
Geschlecht										
männlich	29	70.7	12	29.3		37	68.5	17	31.5	
weiblich	63	58.9	44	41.1	0.256	63	52,5	57	47.5	0.068
Lauren										
diffus	48	87.3	7	12.7		50	79.4	13	20.6	
intestinal	26	43.3	34	56.7		33	46.5	38	53.5	
gemischt	18	54.5	15	45.5	<0.001	17	42.5	23	57.5	< 0.001
Tumorstadium										
T1 / T2	47	59.5	32	40.5		54	50.9	52	49.1	
T3 / T4	45	65.2	24	34.8	0.501	46	67.6	22	32.4	0.041
LK Metastasen										
Negative, N0	20	58.8	14	41.2		20	40.8	29	59.2	
Positive, N+	72	63.2	42	36.8	0.690	80	64.0	45	36.0	0.007
Fernmetastasen										
M0	80	61.1	51	38.9		91	57.6	67	42.4	
M1	12	70.6	5	29.4	0.597	9	56.3	7	43.8	1.000
Grading										
G1 / G2	14	40.0	21	60.0		19	44.2	24	55.8	
G3 / G4	78	69.0	35	31.0	0.003	81	61.8	50	38.2	0.051
R-Status										
Negativ R0	77	59.7	52	40.3		85	54.8	70	45.2	
Positiv, R1	15	78.9	4	21.1	0.132	15	78.9	4	21.1	0.051
UICC										
I / II	34	56.7	26	43.3		41	49.4	42	50.6	
III / IV	58	65.9	30	34.1	0.301	59	64.8	32	35.2	0.047

Legende: XIAP= X-linked inhibitor of apoptosis protein; SSV= Survivin; zyt. = zytosolisch; nuk. = nukleär

Tabelle 15.3: Korrelation klinikopathologische Faktoren mit Survivin und XIAP

	SVV (nuk.) - Zentrum				Wert	SVV (nuk.) – Invasion				Wert
	niedrig n=95		hoch n=53			niedrig n=120		hoch n=54		
Alter	n	%	n	%		n	%	n	%	
≤ Median	52	68.4	24	31.6		66	73.3	24	26,7	
> Median	43	59.7	29	40.3	0.306	54	64.3	30	35.7	0.251
Geschlecht										
männlich	31	75.6	10	24.4		42	76.4	13	23.6	
weiblich	64	59.8	43	40.2	0.086	78	65.0	41	34.5	0.163
Lauren										
diffus	40	72.7	15	27.3		53	84.1	10	15.9	
intestinal	33	55.0	27	45.0		42	60.0	28	40.0	
gemischt	22	66.7	11	33.3	0.133	25	61.0	16	39.0	0.005
Tumorstadium										
T1 / T2	48	60.8	31	39.2		70	66.7	35	33.3	
T3 / T4	47	68.1	22	31.9	0.393	50	72.5	19	27.5	0.503
LK Metastasen										
Negative, N0	21	61.8	13	38.2		29	59.2	20	40.8	
Positive, N+	74	64.9	40	35.1	0.839	91	72.8	34	27.2	0.101
Fernmetastasen										
M0	84	64.1	47	35.9		108	68.4	50	31.6	
M1	11	64.7	6	35.3	1.000	12	75.0	4	25.0	0.778
Grading										
G1 / G2	22	62.9	13	37.1		25	58.1	18	41.9	
G3 / G4	73	64.6	40	35.4	0.843	95	72.5	36	27.5	0.089
R-Status										
Negativ R0	82	63.6	47	36.4		104	67.5	50	32.5	
Positiv, R1	13	68.4	6	31.6	0.801	16	80.0	4	20.0	0.192
UICC										
I / II	32	53.3	28	46.7		51	62.2	31	37.8	
III / IV	63	71.6	25	28.4	0.036	69	75.0	23	25.0	0.074

Legende: XIAP= X-linked inhibitor of apoptosis protein; SSV= Survivin; zyt. = zytosolisch; nuk. = nukleär

3.4 Einfluss Survivin und XIAP auf Überleben und Prognose

Für die Überlebensanalyse wurden die bekannten Merkmale Alter, Geschlecht, die Klassifikation nach Lauren, Tumorgröße/-ausdehnung, negativer beziehungsweise positiver Lymphknotenstatus, Vorhandensein von Fernmetastasen und das UICC- Stadium herangezogen. Auch hier wurde die XIAP und Survivin Expression anhand des IRSs verifiziert.

Für die Untersuchung dieser Merkmale wurde eine univariate Überlebensanalyse gewählt, in die zunächst alle Magenkarzinome, unabhängig vom histologischen Typen, einbezogen wurden. Es konnte herausgestellt werden, dass ein hohes T-Stadium ($p < 0.001$), ein schlechter Differenzierungsgrad ($p = 0.003$), das Vorhandensein von Fernmetastasen, sowie vom Lymphknotenmetastasen ($p < 0.001$), ein fortgeschrittenes UICC Stadium ($p < 0.001$) und eine niedrige zytoplasmatische Survivin Ausprägung in der Invasionsfront signifikant mit einer schlechten Prognose einhergingen (Tabelle 16). XIAP und kernhaltiges Survivin ließen sich hingegen nicht als erhöhte Risikofaktoren evaluieren und gingen mit keiner erhöhten Sterblichkeit einher. Zur Verifizierung dieses Ergebnisses wurde eine multivariate Cox Regressionsanalyse durchgeführt. Durch diese konnten ein fortgeschrittenes UICC-Stadium, der G3/4 Differenzierungsgrad und ein männliches Geschlecht als unabhängige Variablen der Überlebensanalyse, die zur Erklärung der Sterblichkeit beitragen, herausgestellt werden (UICC: HR = 3,061; $p = 0.001$; HR = 2,094; $p = 0.020$; Geschlecht: HR=1,889; $p=0,024$). Veranschaulicht finden sich diese Werte in Tabelle 17 wieder.

Um die Auffälligkeit der statistischen Signifikanz der Expression von Survivin und XIAP in Abhängigkeit des histologischen Typens zu berücksichtigen, wurde zusätzlich für jeden histologischen Typen nach der Klassifikation nach Lauren eine separate Überlebensanalyse durchgeführt.

3.4.1 Intestinaler Typ

In der univariaten Überlebensanalyse konnte eine starke Evidenz beim intestinalen Typ zwischen kürzerer Überlebenszeit und hohem UICC Stadium ($p < 0.001$), schlechtem Differenzierungsgrad ($p = 0.009$), fortgeschrittenen T-Stadium ($p < 0.004$), dem Vorhandensein von Lymphknotenmetstasen ($p = 0.001$), sowie niedriger XIAP Expression im Tumorzentrum, festgestellt werden (Tabelle 16). Als unabhängige prognostische Faktoren konnten das UICC, der Differenzierungsgrad und das Geschlecht in einer multivariaten Analyse als Aussagewert für die Sterblichkeit herausgestellt werden (Tabelle 17).

3.4.2 Gemischter Typ und diffuser Typ nach Lauren

Auch beim diffusen und gemischten Typ nach Lauren erfolgte eine univariate Analyse. Besonders deutlich wurde hierbei die Assoziation zwischen kurzer Überlebenszeit und erhöhter XIAP-Expression im Tumorzentrum des diffusen Typs ($p = 0.034$) (Abbildung 13). Beim diffusen Typ konnte eine Signifikanz zwischen Patientenalter ($p = 0.014$), fortgeschrittenem UICC- Stadium ($p = 0.006$) und Tumorstadium T3/4 ($p < 0.001$), dem Vorhandensein von Fernmetastasen ($p < 0.001$), sowie erhöhter Expression von XIAP im Tumorzentrum ($p = 0.034$) und verringerter Überlebenszeit festgestellt werden (Tabelle 16). Beim gemischten Typ des Magenkarzinoms erwies sich das Tumorstadium 3/4 ($p = 0.005$), UICC Stadien III und IV ($p = 0.001$) und eine hohe Expression von XIAP im Tumorzentrum ($p = 0.017$) als prognostisch relevant. Durch eine multivariate Cox Regressionsanalyse wurde die Unabhängigkeit der genannten Variablen getestet. Hierbei konnte im Kontrast zum intestinalen Typ eine erhöhte XIAP Expression im Tumorzentrum des diffusen und gemischten Typs als unabhängiger prognostischer Faktor herauskristallisiert werden (Tabelle 17). Als weitere unabhängige prognostische Faktoren für den gemischten und diffusen Typen des Magenkarzinoms erwiesen sich das UICC Stadium, das Patientenalter und die Überexpression von XIAP in der Invasionsfront.

Tabelle 16: Univariate Überlebensanalyse

Variable	Magenkarzinom			Intestinaler Typ			diffuser Typ			gemischter Typ		
	HR	95% CI	p Wert	HR	95% CI	p Wert	HR	95% CI	p Wert	HR	95% CI	p Wert
Alter	1.308	0.89 - 1.93	0.172	1.305	0.70 - 2.45	0.406	2.067	1.14 - 3.74	0.014	0.726	0.29 - 1.81	0.491
Geschlecht	1.196	0.78 - 1.83	0.409	1.194	0.57 - 2.52	0.640	1.265	0.69 - 2.33	0.450	1.432	0.51 - 4.01	0.492
T 1/2 vs. T 3/4	3.024	2.02 - 4.53	< 0.001	2.680	1.34 - 5.36	0.004	2.921	1.58 - 5.39	< 0.001	3.855	1.43 - 10.4	0.005
N0 vs. N+	2.066	1.32 - 3.23	0.001	3.184	1.50 - 6.75	0.001	1.244	0.65 - 2.38	0.508	2.059	0.67 - 6.34	0.199
M0 vs. M1	3.723	1.71 - 8.17	< 0.001	1.848	0.25 - 13.6	0.541	8.653	2.35 - 31.8	< 0.001	2.927	0.82 - 10.5	0.084
G 1/2 vs. G 3/4	2.150	1.29 - 3.58	0.003	2.310	1.22 - 4.39	0.009						
UICC I/II vs. III/IV	3.237	2.16 - 4.85	< 0.001	3.789	1.98 - 7.26	< 0.001	2.279	1.25 - 4.15	0.006	6.273	1.88 - 20.9	0.001
XIAP Zentrum	0.922	0.60 - 1.43	0.716	0.392	0.17 - 0.90	0.022	2.048	1.04 - 4.03	0.034	3.669	1.19 - 11.4	0.017
XIAP Invasion	0.716	0.48 - 1.07	0.102	0.607	0.31 - 1.20	0.146	0.918	0.48 - 1.74	0.794	1.229	0.46 - 3.27	0.679
SVV Zentrum (zyt.)	0.824	0.52 - 1.30	0.401	0.802	0.40 - 1.60	0.530	0.906	0.35 - 2.35	0.840	1.089	0.36 - 3.26	0.879
SVV Invasion (zyt.)	0.642	0.42 - 0.98	0.036	0.639	0.34 - 1.21	0.166	0.670	0.28 - 1.62	0.371	0.402	0.15 - 1.08	0.062
SVV Zentrum (nuk.)	0.833	0.52 - 1.34	0.447	0.737	0.36 - 1.50	0.398	1.109	0.51 - 2.41	0.793	1.313	0.40 - 4.29	0.651
SVV Invasion (nuk.)	0.898	0.57 - 1.42	0.644	0.907	0.47 - 1.77	0.773	1.398	0.58 - 3.39	0.456	0.713	0.27 - 1.90	0.497

Legende: T= Tumor; N= Lymphknoten; vs.= versus; G=Grading; XIAP= X-linked inhibitor of apoptosis protein; UICC= Union internationale contre le cancer; SSV= Survivin; zyt= zytosolisch; nuk= nukleär; M= Metastase; HR= Hazard Ratio

Tabelle 17: Multivariate Überlebensanalyse

Variable	Magenkarzinom			intestinaler Typ			diffuser Typ			gemischter Typ		
	HR	95% CI	p Wert	HR	95% CI	p Wert	HR	95% CI	p Wert	HR	95% CI	p Wert
Alter	/			/			3.570	1.48-8.61	0.005	4.104	0.84-19.95	0.080
Geschlecht	1.889	1.09-3.28	0.024	4.165	1.55-11.19	0.005	/			/		
G 1/2 vs. G 3/4	2.094	1.12-3.91	0.020	2.274	1.05-4.92	0.037	/			/		
UICC I/II vs. III/IV	3.061	1.85-5.08	< 0.001	4.658	2.04-10.65	< 0.001	5.756	2.24-14.80	< 0.001	/		
XIAP Zentrum	1.608	0.97-2.68	0.068	/			2.751	1.20-6.29	0.017	3.914	1.07-14.33	0.039
XIAP Invasion	/			/			/			5.786	1.16-28.87	0.032

Legende: G= Grading; XIAP= X-linked inhibitor of apoptosis protein; UICC= Union international contre le cancer; HR= Hazard Ratio

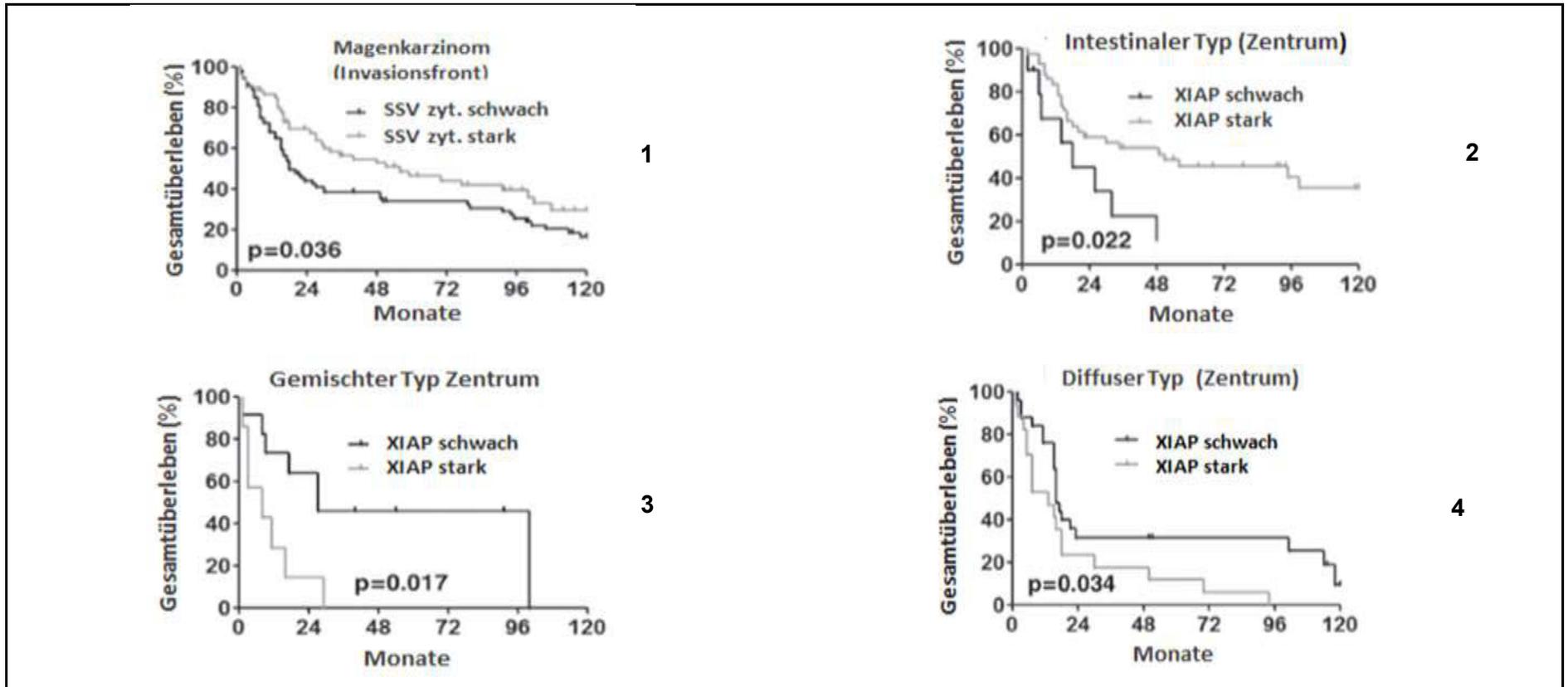


Abbildung 14: Gesamtüberleben Patienten

Gesamtüberleben von Patienten mit Magenkrebs, die nach Survivin (SVV) oder XIAP stratifiziert wurden. Auch hier fand eine Einteilung nach Expressionsintensität statt (IRS > 2 als stark; IRS ≤ 2 als schwach). Die Daten wurden mittels Log-Rank-Tests analysiert. (1) Kaplan-Meier-Kurve, die das Gesamtüberleben mit der zytoplasmatischen SVV-Expression in den Invasionsfronten aller Magenkarzinome korreliert. (2-4) Kaplan-Meier-Kurven, die das Gesamtüberleben mit der XIAP-Expression in den Tumorzentren des (2) intestinalen, (3) diffusen oder (4) gemischten Magenkarzinoms korrelieren

4. Diskussion

Die Prognose von Betroffenen des Magenkarzinoms konnte in der Vergangenheit kaum verbessert werden. Trotz des diagnostischen Fortschrittes, stagniert die 5-Jahres-Überlebensrate bei enttäuschenden 20 Prozent. Die Problematik hierbei liegt besonders in der späten Diagnose des Magenkarzinoms im bereits protrahierten Krankheitsstadium. Leider sind zu diesem Zeitpunkt bei den meisten Patienten bereits Metastasen nachweisbar, oder es handelt sich um eine Rezidivkrankung des primären Magenkarzinoms.¹⁹⁵ Die derzeitigen Therapiestrategien weisen nur eine ernüchternde Bilanz auf und sind zudem sehr aggressiv und stark belastend für den Patienten. Man konnte mit ihnen bislang, wenn überhaupt, nur eine geringe Prognoseverbesserung für die Betroffenen erreichen. Für Erkrankte, die sich bereits in einem fortgeschrittenen Tumorstadium, ohne Möglichkeit der chirurgischen Resektion befanden, lag die mediane Überlebenszeit in hierzu durchgeführten Studien bei unter einem Jahr. Die klassischen Chemotherapien ändern kaum oder nur sehr geringfügig etwas an dieser Tatsache. Cunnunigham et. al konnten unter Behandlung einer Kombination mit Epirubicin, Oxaliplatin, und Capecitabine lediglich eine mediane Überlebenszeit von 11,2 Monaten eruieren. Eine Therapie mit Epirubicin, Cisplatin und Fluorouracil fiel mit 9,9 Monaten medianer Überlebenszeit noch ungünstiger aus.¹⁹⁶ Zwar wiesen Vergleiche zwischen Patienten, die sich einer Chemotherapie unterzogen, einen Überlebensvorteil gegenüber denen auf, die unter „best supportive care“ standen, dennoch gilt es die Toxizität und Belastung der Chemotherapie zu bedenken und der assoziierte Verlust von Lebensqualität muss diesen Ergebnissen kritisch gegenüber gestellt werden.^{20,196,197}

Ideen für neue Therapiestrategien werden diskutiert und ein Umdenken findet statt. Durch die Entdeckung neuer Biologika liegt der Fokus gegenwärtig auf der zielgerichteten Therapie. Biologika können mitunter fehlgeleitete Prozesse und schädliche Signalüberleitungen, die in Tumorzellen überexprimiert sind, positiv beeinflussen, oder sogar stoppen. Bekannt sind zum Beispiel Antagonisten gegen Angiogenesefaktoren, oder gegen den epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR-Antagonisten), sowie Proteasom-Inhibitoren, zu deren Wirksamkeit und Sicherheit bereits Studien liefen.¹⁹⁸⁻²⁰⁰ In der von Bang et. al durchgeführten Phase III ToGa Studie, konnte für den HER2 Rezeptorantagonisten Trastuzumab in Kombination mit einer Chemotherapie beim Magenkarzinom beziehungsweise bei Karzinomen des gastroösophagealen Übergangs, ein Überlebensvorteil von 2,7 Monaten im Median im Vergleich zur alleinigen Chemotherapie evaluiert werden.²⁰¹ Um der Komplexität der Karzinogenese gerecht werden zu können, muss auf dem Gebiet der zielgerichteten Therapie noch viel aufgeklärt werden. Es gilt neue therapeutische Ziele ausfindig zu machen und die Chancen von

Betroffenen, vor allem im Stadium des fortgeschrittenen Magenkarzinoms, zu verbessern und neue Perspektiven zu ermöglichen. Die Therapie mit innovativen Biologikern könnte gerade auch einen potentiellen Vorteil für Patienten, die ein Rezidiv erleiden, erbringen. Neue Therapieschemata könnten eine adjuvante Behandlung verbessern beziehungsweise ergänzen.

Die Intention der vorliegenden Studie war es, solche und auch schon bekannte potentielle Zielstrukturen, detailliert und fokussiert in Bezug auf die jeweiligen Tumorbereiche zu untersuchen. In dieser Studie wurde eine große Anzahl von chirurgisch resezierten Magenkarzinomen retrospektiv untersucht. Das Besondere hierbei war, dass die Expression von Survivin und XIAP nicht nur im Tumorgewebe selbst, sondern auch in den Tumor angrenzenden Bereichen und Lymphknotenmetastasen untersucht wurde. Zusätzlich wurde diese Expressionsintensität mit angrenzendem nicht befallenen Gewebe vergleichend analysiert. Diese genauen Expressionsanalysen der Proteine, bei denen der Fokus auf die Tumorkompartimente gesetzt wurde, führten zu neuen Erkenntnissen, die in dieser Form noch nicht beschrieben wurden.

Die erste Feststellung in unserer Studie war eine erhöhte Expression von Survivin und XIAP im Gewebe des Magenkarzinoms im Vergleich zum Normalgewebe. Gleiche Ergebnisse wurden schon in zuvor publizierten Studien beschrieben und sind konform zu unseren.^{183, 202-204} Insofern kann unser Ergebnis als Bestätigung und weiterer Ansatzpunkt in der zielgerichteten Tumorthherapie gewertet werden. Erst das vermehrte Vorkommen eines charakteristischen Proteins im Tumorgewebe, ermöglicht die Assoziation zum Karzinom und dieses somit als Zielprotein beziehungsweise als Agens zu definieren und den Fokus auf eine gerichtete Beseitigung oder Beeinflussung zu legen.

Die zweite wichtige Beobachtung war eine signifikant erhöhte XIAP Expression in den Lymphknotenmetastasen im Vergleich zum dazugehörigen Primärtumor. Eine besondere Aufmerksamkeit gilt allgemein auch der Fragestellung, ob XIAP gegebenenfalls verschiedene Rollen bei der Entstehung von Metastasen spielt. Bereits Chaouhui Gu et al wiesen in einer bereits kürzlich erschienen Studie nach, dass Silencing von XIAP via MicroRNA 212 die Metastasierung und Migration hemmt.²⁰⁵ Bislang gestand man den IAPs einen gesicherten Einfluss auf die Verhinderung des programmierten Zelltods zu. Dieses Ergebnis unterstützt vor allem aber auch die Theorie, dass IAPs, in unserem Fall insbesondere XIAP, den Weg für die Entstehung von Metastasen ebnen. Die Wirkung von XIAP als Aktivitätsfaktor auf Zellmotilitätskinasen wurde bereits evaluiert. Wie bereits kurz thematisiert, beschrieben Mehtora et al, dass XIAP ist in der Lage sei, gemeinsam mit Survivin einen Komplex einzugehen. Dieser führt dann zu einer Erhöhung von Fibronectin, was zur Aktivierung der Zellmotilitätskinasen FAK und Src führt. So gelang ihnen der Nachweis, dass diese beiden IAPs gemeinsam und direkt an der Ent-

stehung von Metastasen eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielen. Unser Ergebnis kann insofern auch als Bestätigung dazu gewertet werden.¹³⁸ Resümierend könnte also eine zielgerichtete Therapie gegen diese IAPs der Metastasierung vorbeugen und das Voranschreiten minimieren, oder im Idealfall sogar aufhalten. Interessant wird diese Erkenntnis vor allem in der Behandlung des fortgeschrittenen Karzinoms, sowie in der adjuvanten Therapie. Unterstützt wird diese Aussage zudem durch die Beobachtung einer positiven Korrelation zwischen zytoplasmatischen Survivin und XIAP. Dies kann insofern durch bereits stattgefundenen Untersuchungen erklärt werden, die beschreiben, dass das aus dem Mitochondrium ins Zytosol entlassene Survivin mit XIAP in Interaktion treten kann.²⁰⁶ Wie bereits dargestellt, bilden die beiden IAPs einen Komplex, durch den XIAP gegen die Ubiquitin bedingte Degradation geschützt wird.^{72,138,176,207}

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Studie war es aber auch, das wohl zurzeit potenteste IAP, XIAP, in den Fokus zu setzen. Die vorliegende Studie entspricht wohl bislang einer der längsten Untersuchungen, in der retrospektiv der Einfluss der XIAP Expression im Magenkarzinom auf die Prognose und klinikopathologische Parameter analysiert wurde. Signifikante Assoziationen zur Klassifikation nach Lauren, Differenzierungsgrad, Tumorstadium und UICC Stadium konnten ebenfalls evaluiert werden. Eindrucksvoll war auch das Ergebnis, dass gerade der intestinale Typ und gut differenzierte Tumore eine höhere Expression von Survivin und XIAP aufwiesen. Gerade die in dieser Studie gemessene höhere Expression von Survivin und XIAP beim intestinalen Typ und gut differenzierten Tumoren, besonders im frühen Tumorstadium und ohne Lymphknotenmetastasen, lässt vermuten, dass die beiden IAPs bereits einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorentstehung und Progression in früheren Stadien nehmen können. Bereits Zhu et al und Namakura et al wiesen nach, dass eine erhöhte Survivin Expression nicht nur im Magenkarzinom selbst, sondern schon im präkanzerösem und zerstörtem Gewebe festzustellen war und schlossen aus dieser Beobachtung, dass Survivin bereits in der frühen Entwicklung des Magenkarzinom eine entscheidende Rolle spielt.^{208,209}

Im Gegensatz dazu steht eine von Krieg et al 2013 durchgeführte Metaanalyse, bei der eine signifikante Korrelation zwischen einer höheren Intensität der Survivin Expression und Tumoren mit positiven Lymphknotenstatus festgestellt wurde, was eher für eine Assoziation von Survivin zu fortgeschrittenen Tumoren spricht.¹⁷⁹ Hierbei muss jedoch erwähnt werden, dass die in die Metaanalyse einbezogenen Studien zwar im Gesamtergebnis eine Assoziation zwischen der Survivin-Expression und positiven Lymphknotenstatus ergaben, jedoch einzeln betrachtet bereits divergent in ihren Kernaussagen waren und auch Studien, mit dem Ergebnis einer erhöhten Survivin Expression und assoziierten negativem Lymphknotenstatus ebenso repräsentiert waren.^{180,202,210,211}

Andere Studien untermauern jedoch die Ergebnisse der Metaanalyse und zeigen eine Assoziation zwischen einer erhöhten Survivin Expression mit einer vorangeschrittenen Tumorerkrankung.^{182,185,204,212}

Im Einklang mit unseren Ergebnissen stehen die Studien von Shibata T. et al und Kim M.A. et al. Auch hier wurde eine signifikante Korrelation zwischen der XIAP Expressionsintensität und dem intestinalen Typ nach Lauren und gut differenzierten Tumoren festgestellt.^{180,183} Abweichend von unseren Ergebnissen wiesen Kim et al. jedoch eine Korrelation zwischen erhöhter XIAP Expression und einem fortgeschrittenen Magenkarzinom Stadium auf.

Im Fazit kann gesagt werden, dass die Studienlage sehr heterogen ist. Es soll noch mal betont werden, dass in dieser Studie die bestehende signifikante Korrelationen zwischen der Expressionsstärke von beiden getesteten IAPs und gut differenzierten Tumoren sowie frühen Tumorstadien deutlich macht, dass Survivin und XIAP mit der frühen Karzinogenese des Magenkarzinoms in Zusammenhang stehen können. Es ist noch nicht ausreichend untersucht in welchem Umfang dies geschieht, wie die Wirkungsmechanismen sind und zu welchem Zeitpunkt sich dies im zellulären Ablauf ereignet. Auch hier ergeben sich neue wissenschaftliche Ansatzpunkte. Die Divergenz der Ergebnisse verdeutlicht, wie vielseitig die Forschungsmöglichkeiten sind, um das einhergehende Potential der IAPs als Therapieangriffspunkt weiter zu ergründen, zu ergänzen, auszubauen und entsprechend zu nutzen. Es ist zudem wichtig, die Wirkung der beiden IAPs in der frühen Karzinogenese des Magenkarzinoms aufzuklären, um im besten Fall eine Möglichkeit zu etablieren, die den Progress der Krankheit minimieren beziehungsweise das Risiko von Rezidiven verringern kann.

Es ist bereits untersucht worden, dass Survivin und XIAP dem Prozess der Karzinogenese durch ihre Fähigkeit die Apoptose zu verhindern und die Zellproliferation voranzutreiben, protraahieren.^{95,138,147} Dies wiederum führt zunächst zur Erwartung, dass eine Erhöhung beider IAPs mit einer aggressiven Erkrankung und schlechter Prognose assoziiert sind. Bereits in einigen Studien zuvor wurde eine hohe Survivin Expression als negativer Prognosefaktor postuliert und mit einem fortgeschrittenen Krankheitszustand vergesellschaftet.^{182,184,203,209,212} Aber auch hier gibt es divergente Ergebnisse, die ein gewisses Konfliktpotential bieten.

In dieser Studie ließ sich keine Evidenz zwischen der Survivinausprägung und dem Gesamtüberleben feststellen. Für XIAP konnten gegenteilige Feststellungen gemacht werden. Bereits Kim et al konnten demonstrieren, dass die erhöhte XIAP- Expression mit fortgeschrittenen Tumorstadien assoziiert war, negativ mit seinen Antagonisten XAF-1, Smac/DIABLO korrelierte und als unabhängiger Faktor mit einer schlechten Prognose für Patienten mit Magenkarzinom vergesellschaftet war.²¹³ Das besondere an der

vorliegenden Studie im Vergleich zu anderen, ist die detaillierte Überlebensanalyse, bei der insbesondere auch ein Fokus auf XIAP in Bezug auf die einzelnen Tumorkompartimente und den histologischen Typen nach Lauren des Magenkarzinoms gesetzt wurde. Dies schärft und baut die bereits bestehenden Ergebnisse aus und ebnet zugleich den Weg für neue und noch gezieltere Fragestellungen. Wir konnten eine erhöhte XIAP Expression im diffusen und gemischten Typ nach Lauren feststellen und zusätzlich evaluieren, dass eine hohe XIAP-Expression einen unabhängigen negativen Prognosefaktor darstellt, im gemischten und diffusen Typ nach Lauren des Magenkarzinoms. Diese Beobachtungen setzen XIAP als Therapietarget in den Fokus. Aus ihnen können neue Ansätze für die molekulare Antitumortherapie mit XIAP als Zielprotein generiert werden. In unserer Studie fiel zudem die assoziative Tendenz zwischen höherer XIAP Expressionen mit Tumoren ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen auf. Obwohl diese Beobachtung keine statistische Relevanz aufwies, bietet sie dennoch einen Anhalt dafür, dass XIAP, wie bereits erwähnt, eine wesentliche Rolle bei der Entstehung von Magenfrühkarzinomen einnehmen könnte.

Resümierend bleibt zu sagen, dass durch die durchgeführten Survivin und XIAP Expressionsanalysen der verschiedenen Tumorkompartimente, XIAP als prognostischer Marker für den gemischten und diffusen Typen nach Lauren des Magenkarzinoms herauskristallisiert wurde. Somit kann man die Aussage treffen, dass XIAP eines der molekularen Schlüsselproteine darstellt, insbesondere für den diffusen und gemischten Typ des Magenkarzinoms, welche bekannterweise ohnehin mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind. Beide untersuchten IAPs stellen potentielle Kandidaten für eine zielgerichtete Therapie dar. Beide wiesen eine signifikante Überexpression in der Mehrzahl der untersuchten Tumorproben auf. Einige verschiedene Therapieansätze wurden bereits untersucht, unter ihnen auch die zuvor in dieser Arbeit thematisierten und beschriebenen kleinemolekularen IAP Antagonisten und Antisensoligonukleotide. Ihnen kommt eine besondere Aufmerksamkeit zuteil.^{162,171,214} Der zurzeit am besten untersuchte Survivin Antagonist ist das bereits vorgestellte YM155/ Sepantroniumbromid, ein auf Imidazol basierendes kleines Molekül, das in einer Vielzahl von Tumorentitäten eindrucksvolle Anti-Tumor Fähigkeiten aufweisen konnte. Diese wurden bereits in präklinischen Studien, darunter auch für Magenkarzinomzelllinien beschrieben.^{119,215-217} Zudem wurde es in Phase I Studien getestet und erwies eine gute Verträglichkeit bei günstigem Nebenwirkungsprofil.^{218,219} Auch die Anti XIAP-Therapie-Forschung bietet vielversprechende Substanzen und Ergebnisse. So wurde bereits von Wang et. al eine Substanz vorgestellt, mit der man im Stande war XIAP wirksam zu antagonisieren. Der XIAP- Inhibitor Embelin wurde hierbei in vitro getestet und erwies sich als aussichtsreiche Substanz. Dieser war in der Lage, in Magenkarzinomzellen die Apoptose einzuleiten und eine 5 FU Therapie zu verstärken, was mit einer signifikanten Herabsetzung

der Tumorzellüberlebensfähigkeit einherging.²²⁰ Gerade dieses Ergebnis verdeutlicht auch, dass eine synergistische Therapie mit einer konventionellen Chemotherapie durchaus sinnvoll sein kann, wenn man die Tatsache zugrunde legt, dass IAPs das Ansprechen auf eine Chemotherapie reduzieren können.²⁰⁹ Das gilt insbesondere auch für XIAP. In einer Studie von Tong et al wurde die XIAP Expression in Magenkarzinomzellen mittels Antisense RNA reduziert, was mit einer Apoptoseinduktion und erhöhter Sensitivität gegenüber einer Chemotherapie einherging.²²¹ Auch die zuvor beschriebene Wirkung der Smac-Mimetika auf molekularer Ebene stellt somit in XIAP-exprimierenden Tumoren einen Therapieansatz da.^{142,171} Eine weitere aussichtsreiche Möglichkeit für den Anti-XIAP Einsatz bietet die Substanz Birinapat. Erste klinische Studien zeigten, dass die Substanz Birinapat in diesem Fall cIAP inhibierte und zur Verstärkung der Apoptose führte. Zusätzlich wies sie eine stabile Pharmakokinetik und ein relativ günstiges Nebenwirkungsprofil auf.^{169,170} Birinapat ist ein synthetisches kleines Molekül und weist auch bekannte potentielle Affinität zu XIAP auf. Als Smac-Mimetikum und IAP-Antagonist bindet und hemmt Birinapat selektiv die Aktivität von IAPs, wie z.B. XIAP, cIAP1, cIAP2. Damit kann es die Induktion der Apoptose durch apoptotische Signalwege in Krebszellen wiederherstellen und fördern und zudem den NF- κ B-vermittelten Überlebenspfad inaktivieren.^{222,223}

In dieser Studie ließ sich für die Survivin Expression keine signifikante Korrelation zum Gesamtüberleben nachweisen. Wiederholt kann hier nur angemerkt werden, dass es zahlreiche Studien zu diesem IAP gibt, die in ihrer Aussage zu Survivin inkonsistent sind. Die Gründe dafür können vielseitig sein. Einige mögliche Gründe dafür sollen hier erwähnt werden. Kritisch muss angemerkt werden, dass auch die vorliegende Studie einen Rahmen hatte, der gewisse Einschränkungen implizierte. Ein Vorbehalt bietet zum Beispiel die relativ kurze Follow-up-Periode und das Studiendesign als retrospektive Analyse einer einzelnen Institution, was aber eher geringfügiger einzuschätzen ist. Auch hier wurden, wie einer größeren Anzahl der Studien zuvor, die der Definition von potentiellen Zielstrukturen dienen, für den Nachweis von Survivin und XIAP immunhistochemische Färbemethoden angewandt. Zur Detektion verwendenden wir einen polyclonalen Antikörper, der auch alternative Splicevarianten von Survivin detektieren hätte können. Diese biologischen Prämissen der potentiellen Zielantigene müssen beachtet werden, denn sie können zum Beispiel kontroverse Ergebnisse in den korrelativen und prognostischen Aussagen zum Krankheitsstatus bedingen und zusätzlich eine genaue Definition erschweren. So konnten Ling et. al unterschiedliche Wirkungen zweier Spleißvarianten von Survivin beim nicht kleinzelligen Lungenkarzinom verifizieren. Man konnte nachweisen, dass die Survivin Spleißvariante 2B das Zellwachstum hemmt und den programmierten Zelltod förderte. Gegensätzlich wirkte die Variante Survivin Δ Ex3, die das Zellüberleben begünstigte. Im Einklang damit standen auch die

Ergebnisse. Patienten mit der Spleißvariante Survivin 2B wiesen einen günstigeren Krankheitsverlauf auf, als die mit der Variante Survivin Δ Ex3.¹⁰⁰ Auch Krieg et. al. evaluierten eine erniedrigte Expression von Survivin 2B in fortgeschrittenen Tumorstadien des Magenkarzinoms. Man postulierte schon damals, dass die Variante Survivin 2B einen natürlichen Antagonist zur Variante Δ Ex3 darstelle und der Verlust der antiapoptischen Wirkung von 2B zum Tumorprogress führen könne.²²⁴ Somit könnte für den Krankheitsverlauf und die Prognose die Höhe der Expression der jeweiligen Isoform relevant sein und die verstärkte Expression der proapoptischen Spleißvariante 2B mit einer besseren Prognose assoziiert sein. In wie weit welche Variante die Prozesse verändert, was das im Klartext für den Krankheitsverlauf des Patienten bedeuten könnte beziehungsweise welche prognostischen Aussagen gemacht werden könnten und welche IAP Unterform letztendlich ein potentielles Agens für die zielgerichtete Therapie zu sein vermag, kann für das Magenkarzinom zur Zeit nicht abschließend konkretisiert werden. Dafür bedarf es weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen. Für diese Studie muss allerdings deutlich angemerkt werden, dass in bereits von uns durchgeführten früheren Studien zu Detektion von Survivin auch monoklonale sowie polyklonale Antikörper verwendet wurden und keine Survivin-Spleißvarianten auf Proteinebene nachgewiesen werden konnten.²²⁵ Ausdrücklich muss auch erwähnt werden, dass die Spezifität des von uns verwendeten Antikörpers in kürzlich von uns durchgeführten Knock-Down-Experimenten bestätigt wurde.²¹⁵ Somit kann davon ausgegangen werden, dass für die vorliegende Studie der Fehler der Splicevariantenverzerrung eher vernachlässigbar ist.²²⁶

Es gibt bei den Färbemethoden allerdings einige Faktoren, die allgemein Erklärungsansätze zur Divergenz der Ergebnisse, der postulierten Studien bieten könnten. Zu einem könnte die Wahl der Antikörper eine Rolle gespielt haben. Es ist eventuell möglich, dass die Spanne der Affinität der jeweiligen Antikörper zum Zielagens eine Abweichung fördert. Aber auch die Konzentration der Antikörper bei der Färbung, könnte eine mögliche Ursache der Abweichung der Ergebnisse erklären. Zusätzlich gibt es Bereiche, die schwer objektivierbar sind. Die Wahl des Cut off Wertes zum Beispiel obliegt dem Testenden. Die Definition von hoher beziehungsweise schwacher Expression bietet somit auch eine Quelle der Diskrepanz. Die vorangeführten Aspekte stellen aber nur einen Auszug möglicher Ursachen der Divergenz dar, die der wissenschaftlichen Untersuchungsmethodik entspringen.

5. Zusammenfassung

Wir fanden erhöhte Survivin und XIAP Expressionen im Gewebe des Magenkarzinoms. Außerdem konnten wir eine erhöhte XIAP Ausprägung in Lymphknotenmetastasen feststellen im Vergleich zum Primärtumor. Sowohl die Expression von Survivin als auch XIAP wiesen eine signifikante Korrelation zu gut differenzierten Tumoren und frühen Tumorstadien auf.

Insbesondere konnten wir die Expression von XIAP in der Invasionsfront des diffusen und gemischten Typen nach Lauren als unabhängigen prognostischen Faktor herauskristallisieren. Das führt zu der Annahme, dass vor allem Patienten, die vom diffusen oder gemischten Typ des Magenkarzinoms betroffen sind, von einer Therapie mit einem Anti-XIAP-Mittel profitieren könnten. Beide IAPs bieten neues Potential in der zielgerichteten Therapie, einerseits für direkt zur Apoptose führende Mittel, andererseits ergänzend und zur Potenzierung einer Chemotherapie. Ein weiterer möglicher Einsatz wäre eine zielgerichtete Therapie in frühen Stadien zur Risikominimierung der Metastasenentstehung oder eines Rezidivs.

Diese Studie ist die erste, die eine hohe XIAP-Expression als negativen prognostischen Faktor speziell für den gemischten und diffusen Typ nach Lauren des Magenkarzinoms evaluieren konnte. Dieses Ergebnis stellt XIAP in den Fokus einer zielgerichteten Therapie. Neue Forschungsansätze können hierdurch erschlossen werden, wobei hier die am gemischten beziehungsweise diffusen Typen nach Lauren des Magenkarzinoms Erkrankten besonders in das Blickfeld rücken. Diese vielversprechenden Ergebnisse verpflichten zu weiteren Studien mit der Fragestellung, ob zielgerichtete Therapiestrategien mit Anti-XIAP/Survivin Substanzen und direkten Antagonisten, die Prognose von an Magenkarzinom erkrankten Patienten verbessern können. Nur durch den Einsatz dieser neuen Substanzen kann diese Frage beantwortet werden. Die Durchführung von Studien, mit dem Schwerpunkt der Erprobung und Etablierung wirkungsvoller, zielgerichteter Therapeutika, stellt die Herausforderung in der Target-Therapie dar.

Literaturverzeichnis

- 1 WHO. Organization WH. Cancer (Fact sheet No. 297), vol. 2019: WHO website, 2019: Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. (2018).
- 2 Werner Böcker, H. D., Philipp U Heitz, Holger Moch *Pathologie*. Vol. 4 Kapitel 28, S. 708 ff. (Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 2008).
- 3 Kaatsch, P. *et al.* Krebs in Deutschland 2009/2010. (2013).
- 4 Okines, A., Verheij, M., Allum, W., Cunningham, D. & Cervantes, A. Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* **21**, v50-v54 (2010).
- 5 Hans-Peter Bruch, O. T. *Berchtold Chirurgie*. Vol. 6 Kapitel 25, S802 ff. (Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; Auflage: 6 (14. April 2008), 2008).
- 6 Kamada, T. *et al.* Relationship between Gastroesophageal Junction Adenocarcinoma and *Helicobacter pylori* Infection in Japan. *Digestion* **85**, 256-260 (2012).
- 7 The, E. S. G. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *The Lancet* **341**, 1359-1363, doi:[https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)90938-D](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)90938-D) (1993).
- 8 Herold, G. *Innere Medizin*. Kapitel 16.9, S. 450 ff. (Dr. med. Gerd Herold, 2018).
- 9 Shin, C. M. *et al.* Stomach Cancer Risk in Gastric Cancer Relatives: Interaction Between *Helicobacter pylori* Infection and Family History of Gastric Cancer for the Risk of Stomach Cancer. *Journal of Clinical Gastroenterology* **44**, e34-e39, doi:10.1097/MCG.0b013e3181a159c4 (2010).
- 10 Schulte, N. & Ebert, M. Standards der Diagnostik und Therapie des Magenkarzinoms. *Internist* **55**, 925-941, doi:10.1007/s00108-013-3381-x (2014).
- 11 Malfertheiner, P., Bornschein, J. & Büchler, M. Magenkarzinom: Früherkennung und Prävention. *best practice onkologie* **5**, 28-37, doi:10.1007/s11654-010-0249-6 (2010).
- 12 Moehler, M. *et al.* S3-Leitlinie "Magenkarzinom". *Z Gastroenterol* **49**, 461-531 (2011).
- 13 Leake, P.-A. *et al.* A systematic review of the accuracy and indications for diagnostic laparoscopy prior to curative-intent resection of gastric cancer. *Gastric Cancer* **15**, 38-47 (2012).
- 14 Hölscher, A. H. *et al.* Early gastric cancer: lymph node metastasis starts with deep mucosal infiltration. *Annals of surgery* **250**, 791-797 (2009).
- 15 Woeste, G., Al-Batran, S. E., Albert, J. & Trojan, J. Diagnostik und Therapie des Magenkarzinoms. *Onkologie* **20**, 1139-1152, doi:10.1007/s00761-014-2792-1 (2014).
- 16 Möhler, M., Pech, O. & Hoffman, A. Frühe Karzinome des Magens und ösophagogastralen Übergangs. *Onkologie* **19**, 354-362, doi:10.1007/s00761-012-2415-7 (2013).
- 17 Hölscher, A. *et al.* Aktuelle S3-Leitlinie zur Chirurgie des Magenkarzinoms. *Der Chirurg* **83**, 31-37 (2012).
- 18 Meyer, H. J., Opitz, G. J. & Wilke, H. Magenkarzinom. *Allgemein- und Viszeralchirurgie update* **4**, 363-385, doi:10.1055/s-0030-1250580 (2010).
- 19 Al-Batran, S. E., Eble, M. & Mönig, S. P. Behandlungsalgorithmen für Adenokarzinome des Magens oder ösophagogastralen Übergangs. *Onkologie* **19**, 352-353, doi:10.1007/s00761-013-2465-5 (2013).
- 20 Wagner, A. D. *et al.* Chemotherapy for advanced gastric cancer. *Cochrane Database Syst Rev* **3** (2010).
- 21 Pazo Cid, R. A. & Antón, A. Advanced HER2-positive gastric cancer: Current and future targeted therapies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* **85**, 350-362, doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2012.08.008> (2013).
- 22 Lüllman-Rauch, R. *Taschenlehrbuch Histologie*. Vol. 3 (Thieme, 2009).
- 23 Chen, G. & Goeddel, D. V. TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science* **296**, 1634-1635, doi:10.1126/science.1071924 (2002).

- 24 Wajant, H. The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. *Science* **296**, 1635-1636, doi:10.1126/science.1071553 (2002).
- 25 Berry, D. Molecular Animation of Cell Death Mediated by the Fas Pathway. *Science's STKE* **2007**, tr1-tr1, doi:10.1126/stke.3802007tr1 (2007).
- 26 Acehan, D. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell* **9**, 423 (2002).
- 27 Slee, E. A. *et al.* Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of Cell Biology* **144**, 281-292 (1999).
- 28 Dejean, L. M., Martinez-Caballero, S. & Kinnally, K. W. Is MAC the knife that cuts cytochrome c from mitochondria during apoptosis? *Cell death and differentiation* **13**, 1387, doi:10.1038/sj.cdd.4401949 (2006).
- 29 Bennighof, D. *Anatomie Band I*. 1 edn, Vol. 17 87-88 (Elsevier, 2008).
- 30 Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V. & Baldwin, A. S. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**, 1680-1683 (1998).
- 31 Duckett, C. S. *et al.* A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO Journal* **15**, 2685-2694 (1996).
- 32 Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. & Reed, J. C. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *The EMBO journal* **16**, 6914-6925 (1997).
- 33 Birnbaum, M. J., Clem, R. J. & Miller, L. K. An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motifs. *Journal of virology* **68**, 2521-2528 (1994).
- 34 Crook, N. E., Clem, R. J. & Miller, L. K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of virology* **67**, 2168-2174 (1993).
- 35 Verhagen, A., Coulson, E. & Vaux, D. Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *GenomeBiology.com* **2** (2001).
- 36 Roy, N. *et al.* The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* **80**, 167-178 (1995).
- 37 Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J. & Goeddel, D. V. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78**, 681-692 (1994).
- 38 Rothe, M., Pan, M. G., Henzel, W. J., Ayres, T. M. & Goeddel, D. V. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* **83**, 1243-1252 (1995).
- 39 Shu, H. B., Takeuchi, M. & Goeddel, D. V. The tumor necrosis factor receptor 2 signal transducers TRAF2 and c-IAP1 are components of the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 13973-13978 (1996).
- 40 Ambrosini, G., Adida, C. & Altieri, D. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nature medicine* **3**, 917-921 (1997).
- 41 Adida, C. *et al.* Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *The American journal of pathology* **152** (1998).
- 42 Ambrosini, G., Adida, C., Sirugo, G. & Altieri, D. C. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *The Journal of biological chemistry* **273**, doi:10.1074/jbc.273.18.11177 (1998).
- 43 Hauser, H. P., Bardroff, M., Pyrowolakis, G. & Jentsch, S. A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol* **141**, 1415-1422 (1998).
- 44 Chen, Z. *et al.* A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* **264**, 847-854, doi:10.1006/bbrc.1999.1585 (1999).

- 45 Vucic, D., Stennicke, H. R., Pisabarro, M. T., Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas. *Curr Biol* **10**, 1359-1366 (2000).
- 46 Lin, J. H., Deng, G., Huang, Q. & Morser, J. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Biochemical and biophysical research communications* **279**, 820-831, doi:10.1006/bbrc.2000.4027 (2000).
- 47 Kasof, G. M. & Gomes, B. C. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *The Journal of biological chemistry* **276**, 3238-3246, doi:10.1074/jbc.M003670200 (2001).
- 48 Richter, B. W. *et al.* Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Molecular and cellular biology* **21**, 4292-4301, doi:10.1128/mcb.21.13.4292-4301.2001 (2001).
- 49 Lagace, M. *et al.* Genomic organization of the X-linked inhibitor of apoptosis and identification of a novel testis-specific transcript. *Genomics* **77**, 181-188, doi:10.1006/geno.2001.6635 (2001).
- 50 Clem, R. J. & Miller, L. K. Control of programmed cell death by the baculovirus genes p35 and iap. *Molecular and cellular biology* **14**, 5212-5222 (1994).
- 51 +Salvesen, G. & Duckett, C. Apoptosis: IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **3**, 401-410 (2002).
- 52 Deveraux, Q. L. & Reed, J. C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes & development* **13**, 239-252 (1999).
- 53 Reed, J., Deveraux, Q., Takahashi, R. & Salvesen, G. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300-304 (1997).
- 54 Koonin, E. V. & Aravind, L. The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends in biochemical sciences* **25**, 223-224 (2000).
- 55 Li, F. *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* **396**, 580-584, doi:10.1038/25141 (1998).
- 56 Yang, Y. & Yu, X. Regulation of apoptosis: the ubiquitous way. *The FASEB journal* **17**, 790-799 (2003).
- 57 Yang, Y. & Li, X. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Research* **10**, 169-177 (2000).
- 58 Qiu, X. B. & Goldberg, A. L. The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and caspase-9. *The Journal of biological chemistry* **280**, 174-182, doi:10.1074/jbc.M411430200 (2005).
- 59 Zarnegar, B. J. *et al.* Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* **9**, 1371-1378, doi:10.1038/ni.1676 (2008).
- 60 Ma, O. *et al.* MMP13, Birc2 (cIAP1), and Birc3 (cIAP2), amplified on chromosome 9, collaborate with p53 deficiency in mouse osteosarcoma progression. *Cancer research* **69**, 2559-2567, doi:10.1158/0008-5472.can-08-2929 (2009).
- 61 Zender, L. *et al.* Identification and validation of oncogenes in liver cancer using an integrative oncogenomic approach. *Cell* **125**, 1253-1267, doi:10.1016/j.cell.2006.05.030 (2006).
- 62 Bertrand, M. J. M. *et al.* cIAP1 and cIAP2 Facilitate Cancer Cell Survival by Functioning as E3 Ligases that Promote RIP1 Ubiquitination. *Molecular cell* **30**, 689-700 (2008).
- 63 Kenneth, N. S. & Duckett, C. S. IAP proteins: regulators of cell migration and development. *Current opinion in cell biology* **24**, 871-875, doi:10.1016/j.ceb.2012.11.004 (2012).
- 64 Oberoi-Khanuja, T. K., Murali, A. & Rajalingam, K. IAPs on the move: role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration. *Cell death & disease* **4**, e784, doi:10.1038/cddis.2013.311 (2013).

- 65 Uren, A. G. *et al.* Role for yeast inhibitor of apoptosis (IAP)-like proteins in cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 10170-10175 (1999).
- 66 Uren, A. G. *et al.* Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol* **10**, doi:10.1016/s0960-9822(00)00769-7 (2000).
- 67 Silke, J. & Vaux, D. L. Two kinds of BIR-containing protein - inhibitors of apoptosis, or required for mitosis. *J Cell Sci* **114**, 1821-1827 (2001).
- 68 Speliotes, E. K., Uren, A., Vaux, D. & Horvitz, H. R. The Survivin-like *C. elegans* BIR-1 Protein Acts with the Aurora-like Kinase AIR-2 to Affect Chromosomes and the Spindle Midzone. *Molecular cell* **6**, 211-223, doi:https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00023-X (2000).
- 69 Tamm, I. *et al.* IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer research* **58**, 5315-5320 (1998).
- 70 Kobayashi, K., Hatano, M., Otaki, M., Ogasawara, T. & Tokuhsa, T. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 1457-1462 (1999).
- 71 Mahotka, C., Wenzel, M., Springer, E., Gabbert, H. E. & Gerharz, C. D. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. *Cancer research* **59** (1999).
- 72 Dohi, T. *et al.* An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *Journal of biological chemistry* **279**, 34087-34090 (2004).
- 73 Martin, S. J. An Apollon vista of death and destruction. *Nature Cell Biology* **6**, 804, doi:10.1038/ncb0904-804 (2004).
- 74 Hao, Y. *et al.* Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function. *Nat Cell Biol* **6**, 849-860, doi:10.1038/ncb1159 (2004).
- 75 Ma, L. *et al.* Livin promotes Smac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway. *Cell death and differentiation* **13**, 2079-2088, doi:10.1038/sj.cdd.4401959 (2006).
- 76 LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G. & MacKenzie, A. E. The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**, 3247-3259 (1998).
- 77 Li, F. & Altieri, D. C. Transcriptional analysis of human survivin gene expression. *The Biochemical journal* **344**, 305-311 (1999).
- 78 Xu, R. *et al.* Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the survivin gene. *Biochemical and biophysical research communications* **356**, 286-292, doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.02.140 (2007).
- 79 Tazo, Y. Bifunctional roles of survivin-ΔEx3 and survivin-2B for susceptibility to apoptosis in endometrial carcinomas. *Journal of cancer research and clinical oncology* **140**, 2027 (2014).
- 80 Li, F. & Altieri, D. C. The Cancer Antiapoptosis Mouse *Survivin* Gene. *Characterization of Locus and Transcriptional Requirements of Basal and Cell Cycle-dependent Expression* **59**, 3143-3151 (1999).
- 81 Badran, A. *et al.* Identification of a novel splice variant of the human anti-apoptosis gene survivin. *Biochemical and biophysical research communications* **314**, 902-907 (2004).
- 82 Duffy, M., Odonovan, N., Brennan, D., Gallagher, W. & Ryan, B. Survivin: A promising tumor biomarker. *Cancer letters* **249**, 49-60 (2007).
- 83 Caldas, H., Honsey, L. E. & Altura, R. A. Survivin 2α: a novel Survivin splice variant expressed in human malignancies. *Molecular cancer* **4**, 11, doi:10.1186/1476-4598-4-11 (2005).
- 84 Caldas, H. *et al.* Survivin splice variants regulate the balance between proliferation and cell death. *Oncogene* **24**, 1994, doi:10.1038/sj.onc.1208350 (2005).

- 85 Engelsma, D., Rodriguez, J., Fish, A., Giaccone, G. & Fornerod, M. Homodimerization
Antagonizes Nuclear Export of Survivin. *Traffic* **8**, 1495-1502 (2007).
- 86 Fengzhi, L., Jie, Y., Nithya, R., M., J. M. & Dongfeng, T. Nuclear or cytoplasmic
expression of survivin: What is the significance? *International Journal of Cancer* **114**,
509-512, doi:doi:10.1002/ijc.20768 (2005).
- 87 Uren, A. *et al.* Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-
cycle localization and gene knockout phenotype. *Current biology* **10**, 1319-1328 (2000).
- 88 Altieri, D. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. *Nature*
reviews. Cancer **8**, 61-70 (2008).
- 89 Ruchaud, S., Carmena, M. & Earnshaw, W. The Chromosomal Passenger Complex: One
for All and All for One. *Cell* **131**, 230-231 (2007).
- 90 Lamers, F. *et al.* Knockdown of survivin (BIRC5) causes apoptosis in neuroblastoma via
mitotic catastrophe. *Endocrine-related cancer* **18**, 657-668 (2011).
- 91 Khan, S. *et al.* Localization and upregulation of survivin in cancer health disparities: a
clinical perspective. *Biologics : Targets & Therapy* **9**, 57-67, doi:10.2147/BTT.S83864
(2015).
- 92 Marusawa, H. *et al.* HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression.
EMBO Journal **22**, 2729-2740 (2003).
- 93 Grossman, D. *et al.* Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-
induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *Journal of Clinical Investigation*
108, 991-999 (2001).
- 94 Conway, E. *et al.* Deficiency of survivin in transgenic mice exacerbates Fas-induced
apoptosis via mitochondrial pathways. *Gastroenterology* **123**, 619-631 (2002).
- 95 Mita, A., Mita, M., Nawrocki, S. & Giles, F. Survivin: key regulator of mitosis and
apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clinical cancer research* **14**, 5000-
5005 (2008).
- 96 Pavlyukov, M. *et al.* Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation.
Journal of biological chemistry **286**, 23296-23307 (2011).
- 97 Tanaka, K. *et al.* Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast
carcinomas. *Clinical cancer research* **6**, 127-134 (2000).
- 98 Mori, N. *et al.* Expression of Survivin in HTLV-I-Infected T-Cell Lines and Primary ATL
Cells. *Biochemical and biophysical research communications* **282**, 1110-1113 (2001).
- 99 Takamizawa, S. *et al.* The survivin: Fas ratio in pediatric renal tumors. *Journal of*
pediatric surgery **36**, 37-42 (2001).
- 100 Ling, X. *et al.* Differential expression of survivin-2B and survivin-ΔEx3 is inversely
associated with disease relapse and patient survival in non-small-cell lung cancer
(NSCLC). *Lung Cancer* **49**, 353-361 (2005).
- 101 Sandler, A., Scott, D., Azuhata, T., Takamizawa, S. & O'Dorisio, S. The survivin: Fas ratio
is predictive of recurrent disease in neuroblastoma. *Journal of pediatric surgery* **37**,
507-511 (2002).
- 102 Wang, T.-T., Qian, X.-P. & Liu, B.-R. Survivin: potential role in diagnosis, prognosis and
targeted therapy of gastric cancer. *World Journal of Gastroenterology* **13**, 2784-2790
(2007).
- 103 Terashima, M. *et al.* 661PPROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF SURVIVIN EXPRESSION IN
PATIENTS WITH GASTRIC CANCER. *Annals of Oncology* **25**, iv226-iv226 (2014).
- 104 Li, Y. *et al.* Downregulation of survivin inhibits proliferation and migration of human
gastric carcinoma cells. *Int J Clin Exp Pathol* **8**, 1731-1736 (2015).
- 105 Mirza, A. *et al.* Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and
participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* **21**, 2613-2622 (2002).
- 106 Hoffman, W., Biade, S., Zilfou, J., Chen, J. & Murphy, M. Transcriptional repression of
the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *Journal of biological chemistry* **277**,
3247-3257 (2002).

- 107 Yie, S.-m. *et al.* Detection of survivin-expressing circulating cancer cells (CCCs) in peripheral blood of patients with gastric and colorectal cancer reveals high risks of relapse. *Annals of surgical oncology* **15**, 3073-3082 (2008).
- 108 Liu, J. L., Gao, W., Kang, Q. M., Zhang, X. J. & Yang, S. G. Prognostic value of survivin in patients with gastric cancer: a systematic review with meta-analysis. *PloS one* **8**, e71930, doi:10.1371/journal.pone.0071930 (2013).
- 109 Lu, C.-D., Altieri, D. C. & Tanigawa, N. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer research* **58**, 1808-1812 (1998).
- 110 Kania, J., Konturek, S., Marlicz, K., Hahn, E. & Konturek, P. Expression of survivin and caspase-3 in gastric cancer. *Digestive diseases and sciences* **48**, 266-271 (2003).
- 111 Wang, T. *et al.* Gambogic acid, a potent inhibitor of survivin, reverses docetaxel resistance in gastric cancer cells. *Cancer letters* **262**, 214-222 (2008).
- 112 Yu, J. *et al.* Increased expression of survivin in gastric cancer patients and in first degree relatives. *British journal of cancer* **87**, 91-97 (2002).
- 113 Okada, E. *et al.* Survivin expression in tumor cell nuclei is predictive of a favorable prognosis in gastric cancer patients. *Cancer letters* **163**, 109-116 (2001).
- 114 Bertazza, L. *et al.* Survivin gene levels in the peripheral blood of patients with gastric cancer independently predict survival. *Journal of translational medicine* **7**, 1 (2009).
- 115 Meng, J.-R., Tang, H.-Z., Zhou, K.-Z., Shen, W.-H. & Guo, H.-Y. TFF3 and survivin expressions associate with a lower survival rate in gastric cancer. *Clinical and experimental medicine* **13**, 297-303 (2013).
- 116 Glaros, T. *et al.* The "survivin suppressants" NSC 80467 and YM155 induce a DNA damage response. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **70**, 207-212 (2012).
- 117 Ling, X. *et al.* A Novel Small Molecule FL118 That Selectively Inhibits Survivin, Mcl-1, XIAP and cIAP2 in a p53-Independent Manner, Shows Superior Antitumor Activity. *PloS one* **7**, e45571 (2012).
- 118 Hansen, J. *et al.* SPC3042: a proapoptotic survivin inhibitor. *Molecular cancer therapeutics* **7**, 2736-2745 (2008).
- 119 Nakahara, T. *et al.* YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer research* **67**, 8014-8021 (2007).
- 120 Yamauchi, T. *et al.* Sepantronium Bromide (YM155) induces disruption of the ILF3/p54nrb complex, which is required for survivin expression. *Biochemical and biophysical research communications* **425**, 711-716 (2012).
- 121 Nakamura, N. *et al.* Interleukin enhancer-binding factor 3/NF110 is a target of YM155, a suppressant of survivin. *Molecular & cellular proteomics* **11**, M111.013243 (2012).
- 122 Sachita, K., Yu, H.-J., Yun, J.-W., Lee, J.-S. & Cho, S.-D. YM155 induces apoptosis through downregulation of specificity protein 1 and myeloid cell leukemia-1 in human oral cancer cell lines. *Journal of oral pathology & medicine* **44**, 785-791 (2015).
- 123 Takeuchi, H. *et al.* X-Linked inhibitor of apoptosis protein expression level in colorectal cancer is regulated by hepatocyte growth factor/C-met pathway via Akt signaling. *Clinical cancer research* **11**, 7621-7628 (2005).
- 124 Listen, P. *et al.* Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* **379**, 349-353 (1996).
- 125 LaCasse, E. C. Pulling the plug on a cancer cell by eliminating XIAP with AEG35156. *Cancer letters* **332**, 215-224, doi:https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.06.015 (2013).
- 126 Deveraux, Q. L. *et al.* Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO Journal* **18**, 5242-5251 (1999).
- 127 Holcik, M., Gibson, H. & Korneluk, R. G. XIAP: apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **6**, 253-261 (2001).

- 128 Yang, L. *et al.* Predominant Suppression of Apoptosome by Inhibitor of Apoptosis Protein in Non-Small Cell Lung Cancer H460 Cells Therapeutic Effect of a Novel Polyarginine-conjugated Smac Peptide. *Cancer research* **63**, 831-837 (2003).
- 129 Schimmer, A. D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer research* **64**, 7183-7190 (2004).
- 130 Dean, E., Ranson, M., Blackhall, F. & Dive, C. X-linked inhibitor of apoptosis protein as a therapeutic target. *Expert opinion on therapeutic targets* **11**, 1459-1471 (2007).
- 131 Lewis, J. *et al.* Uncoupling of the signaling and caspase-inhibitory properties of X-linked inhibitor of apoptosis. *Journal of biological chemistry* **279**, 9023-9029 (2004).
- 132 Vlahopoulos, S. A. Aberrant control of NF- κ B in cancer permits transcriptional and phenotypic plasticity, to curtail dependence on host tissue: molecular mode. *Cancer Biology & Medicine* **14**, 254-270, doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0029 (2017).
- 133 Sheikh, M. S. Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1. *Cell cycle* **2**, 549 (2003).
- 134 Rothe, M. *et al.* I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 8241-8246, doi:10.1073/pnas.93.16.8241 (1996).
- 135 Hofer-Warbinek, R. *et al.* Activation of NF-kappa B by XIAP, the X chromosome-linked inhibitor of apoptosis, in endothelial cells involves TAK1. *The Journal of biological chemistry* **275**, 22064-22068, doi:10.1074/jbc.M910346199 (2000).
- 136 Karin, M. How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene* **18**, 6867, doi:10.1038/sj.onc.1203219 (1999).
- 137 Karin, M. & Lin, A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nature Immunology* **3**, 221-227 (2002).
- 138 Mehrotra, S. *et al.* IAP Regulation of Metastasis. *Cancer cell* **17**, 53-64 (2010).
- 139 Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M. & Ashwell, J. D. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* **288**, 874-877 (2000).
- 140 Huang, Y. *et al.* Structural Basis of Caspase Inhibition by XIAP. *Cell* **104**, 781-790 (2001).
- 141 Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., Nakata, K., Reed, J. C. & Takahashi, R. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *Journal of biological chemistry* **276**, 27058-27063 (2001).
- 142 Schimmer, A. D., Dalili, S., Batey, R. A. & Riedl, S. J. Targeting XIAP for the treatment of malignancy. *Cell death and differentiation* **13**, 179-188 (2006).
- 143 MacFarlane, M., Merrison, W., Bratton, S. & Cohen, G. Proteasome-mediated degradation of Smac during apoptosis: XIAP promotes Smac ubiquitination in vitro. *Journal of biological chemistry* **277**, 36611-36616 (2002).
- 144 Liston, P. *et al.* Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity. *Nature Cell Biology* **3**, 128-133 (2001).
- 145 Verhagen, A. M. & Vaux, D. L. Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* **7**, 163-166 (2002).
- 146 Yang, Q.-H., Church Hajduk, R., Ren, J., Newton, M. & Du, C. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes & development* **17**, 1487-1496 (2003).
- 147 Srinivasula, S. *et al.* Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *Journal of biological chemistry* **278**, 31469-31472 (2003).
- 148 Verhagen, A. *et al.* Identification of DIABLO, a Mammalian Protein that Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins. *Cell* **102**, 43-53 (2000).
- 149 Chauhan, D. *et al.* Apaf-1/cytochrome c-independent and Smac-dependent induction of apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *Journal of biological chemistry* **276**, 24453-24456 (2001).

- 150 Ekert, P. G., Silke, J., Hawkins, C. J., Verhagen, A. M. & Vaux, D. L. DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *The Journal of cell biology* **152**, 483-490 (2001).
- 151 Zheng, L.-D., Tong, Q.-S., Wang, L., Liu, J. & Qian, W. Stable transfection of extrinsic Smac gene enhances apoptosis-inducing effects of chemotherapeutic drugs on gastric cancer cells. *World Journal of Gastroenterology* **11**, 79-83 (2005).
- 152 Tamm, I. *et al.* Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias. *Clinical cancer research* **6**, 1796-1803 (2000).
- 153 Holcik, M., Yeh, C., Korneluk, R. G. & Chow, T. Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death. *Oncogene* **19**, 4174-4177 (2000).
- 154 McNeish, I. A. *et al.* Expression of Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells induces apoptosis via a caspase-9-mediated pathway. *Experimental cell research* **286**, 186-198 (2003).
- 155 Yu, J., Wang, P., Ming, L., Wood, M. A. & Zhang, L. SMAC/Diablo mediates the proapoptotic function of PUMA by regulating PUMA-induced mitochondrial events. *Oncogene* **26**, 4189-4198 (2007).
- 156 Vucic, D. *et al.* SMAC negatively regulates the anti-apoptotic activity of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP). *Journal of biological chemistry* **277**, 12275-12279 (2002).
- 157 Zeng, H. *et al.* Knockdown of Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase Expression by RNAi Enhances Growth and Cisplatin Resistance of Human Lung Cancer Cells. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* **25**, 705-712 (2010).
- 158 Bai, L., Smith, D. & Wang, S. Small-molecule SMAC mimetics as new cancer therapeutics. *Pharmacology & therapeutics* **144**, 82-95 (2014).
- 159 Shi, Y. A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nature structural biology* **8**, 394-401 (2001).
- 160 Martinez Ruiz, G. *et al.* Ectopic expression of new alternative splice variant of Smac/DIABLO increases mammospheres formation. *International journal of clinical and experimental pathology* **7**, 5515-5526 (2014).
- 161 Y.M. Anguiano-Hernandez, 2,3 A. Chartier1 and S. Huerta. Smac/DIABLO and Colon Cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, Publisher:Bentham Science Publishers Ltd. Volume 7, Number 4*, 467-473 (2007).
- 162 LaCasse, E. C. *et al.* IAP-targeted therapies for cancer. *Oncogene* **27**, 6252-6275 (2008).
- 163 Dobrzycka, B. *et al.* Prognostic significance of smac/DIABLO in endometrioid endometrial cancer. *Folia Histochemica et Cytobiologica* **48**, 678 (2011).
- 164 Sun, Q., Zheng, X., Zhang, L. & Yu, J. Smac modulates chemosensitivity in head and neck cancer cells through the mitochondrial apoptotic pathway. *Clinical cancer research* **17**, 2361-2372 (2011).
- 165 Bao, S. T. Relationship between expression of Smac and Survivin and apoptosis of primary hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* **5**, 580 (2006).
- 166 Zhao, J. Transfection of Smac sensitizes tumor cells to etoposide-induced apoptosis and eradicates established human hepatoma in vivo. *Cancer gene therapy* **13**, 420 (2006).
- 167 Tirrò, E. *et al.* Altered expression of c-IAP1, survivin, and Smac contributes to chemotherapy resistance in thyroid cancer cells. *Cancer research* **66**, 4263-4272 (2006).
- 168 Endo, K. Clinical significance of Smac/DIABLO expression in colorectal cancer. *Oncology reports* **21**, 351 (2009).
- 169 Amaravadi, R. *et al.* A Phase I Study of the SMAC-Mimetic Birinapant in Adults with Refractory Solid Tumors or Lymphoma. *Molecular Cancer Therapeutics (MCT)* **14**, 2569-2575 (2015).

- 170 M., N. A. *et al.* Pharmacodynamic markers and clinical results from the phase 2 study
of the SMAC mimetic birinapant in women with relapsed platinum-resistant or -
refractory epithelial ovarian cancer. *Cancer* **122**, 588-597, doi:doi:10.1002/cncr.29783
(2016).
- 171 Fulda, S. & Vucic, D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer.
Nature reviews. Drug discovery **11**, 109-124 (2012).
- 172 Wagner, A. & Moehler, M. Development of targeted therapies in advanced gastric
cancer: promising exploratory steps in a new era. *Current opinion in oncology* **21**, 381-
385 (2009).
- 173 Srinivasula, S. & Ashwell, J. IAPs: What's in a Name? *Molecular cell* **30**, 123-135 (2008).
- 174 Altieri, D. C. New wirings in the survivin networks. *Oncogene* **27**, 6276-6284 (2008).
- 175 Altieri, D. Survivin – The inconvenient IAP. *Seminars in cell & developmental biology* **39**,
91-96 (2015).
- 176 Dohi, T., Beltrami, E., Wall, N., Plescia, J. & Altieri, D. Mitochondrial survivin inhibits
apoptosis and promotes tumorigenesis. *Journal of Clinical Investigation* **114**, 1117-
1127 (2004).
- 177 Krieg, A. *et al.* XIAP mediates NOD signaling via interaction with RIP2. *Proceedings of
the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 14524-14529
(2009).
- 178 Krieg, A. & Reed, J. IAPs and their emergent role in NLR signaling. *Cell cycle* **9**, 426-427
(2010).
- 179 Krieg, A. *et al.* Role of survivin as prognostic and clinicopathological marker in gastric
cancer: a meta-analysis. *Molecular biology reports* **40**, 5501-5511 (2013).
- 180 Kim, M., Lee, H., Yang, H.-K. & Kim, W. Expression of apoptosis-related proteins and its
clinical implication in surgically resected gastric carcinoma. *Virchows Archiv* **459**, 503-
510 (2011).
- 181 Shibata, T. *et al.* Disturbed Expression of the Apoptosis Regulators XIAP, XAF1, and
Smac/DIABLO in Gastric Adenocarcinomas. *Diagnostic Molecular Pathology* **16**, 1-8,
doi:10.1097/01.pdm.0000213471.92925.51 (2007).
- 182 Lee, G. H. *et al.* Expression of survivin in gastric cancer and its relationship with tumor
angiogenesis. *European journal of gastroenterology & hepatology* **18**, 957-963,
doi:10.1097/01.meg.0000230086.83792.56 (2006).
- 183 Shibata, T. *et al.* Disturbed XIAP and XAF1 Expression Balance Is an Independent
Prognostic Factor in Gastric Adenocarcinomas. *Annals of Surgical Oncology* **15**, 3579-
3587 (2008).
- 184 Song, K. Y., Jung, C. K., Park, W. S. & Park, C. H. Expression of the antiapoptosis gene
Survivin predicts poor prognosis of stage III gastric adenocarcinoma. *Japanese journal
of clinical oncology* **39**, 290-296, doi:10.1093/jjco/hyp020 (2009).
- 185 Meng, J. R., Tang, H. Z., Zhou, K. Z., Shen, W. H. & Guo, H. Y. TFF3 and survivin
expressions associate with a lower survival rate in gastric cancer. *Clinical and
experimental medicine* **13**, 297-303, doi:10.1007/s10238-012-0210-9 (2013).
- 186 Kononen, J. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor
specimens. *Nature medicine* **4**, 844-847 (1998).
- 187 Battifora, H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for
immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest* **55**, 244-248 (1986).
- 188 Kallioniemi, O. P. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling
of cancer. *Human molecular genetics* **10**, 657 (2001).
- 189 Merseburger, A., Hennenlotter, J., Horstmann, M., Kuczyk, M. & Stenzl, A. Die Tissue
Microarray-Technik als neues. *Journal für Urologie und Urogynäkologie* **10**, 7-11
(2003).
- 190 McShane, L. M. *et al.* REporting recommendations for tumour MARKer prognostic
studies (REMARK). *British journal of cancer* **93**, 387-391 (2005).
- 191 Lang, G. in *Histotechnik* Vol. 2 Ch. 12, 271 ff. (Springer Vienna, 2013).

- 192 Noll Sabine, S.-K. S. *Praxis der Immunhistochemie*. 1 edn, Vol. 1 (Heinz Höfler, Klaus-
Michael Müller, 2000).
- 193 Remmele, W. & Stegner, H. E. [Recommendation for uniform definition of an
immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-
ICA) in breast cancer tissue]. *Der Pathologe* **8**, 138-140 (1987).
- 194 [https://www.pathologievechta.de/deu/physicians/knowledgebase/classifications/
hormone & _receptors.php](https://www.pathologievechta.de/deu/physicians/knowledgebase/classifications/hormone_%20receptors.php).
- 195 Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2012. *Ca : a Cancer Journal for
Clinicians* **62**, 10-29 (2012).
- 196 Cunningham, D., Okines, A. F. & Ashley, S. Capecitabine and oxaliplatin for advanced
esophagogastric cancer. *The New England journal of medicine* **362**, 858-859,
doi:10.1056/NEJMc0911925 (2010).
- 197 Guimbaud, R. *et al.* Prospective, randomized, multicenter, phase III study of
fluorouracil, leucovorin, and irinotecan versus epirubicin, cisplatin, and capecitabine in
advanced gastric adenocarcinoma: a French intergroup (Fédération Francophone de
Cancérologie Digestive, Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer,
and Groupe Coopérateur Multidisciplinaire en Oncologie) study. *Journal of clinical
oncology* **32**, 3520-3526 (2014).
- 198 Okines, A. F. C. *et al.* Epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine with or without
panitumumab for advanced esophagogastric cancer: dose-finding study for the
prospective multicenter, randomized, phase II/III REAL-3 trial. *Journal of clinical
oncology* **28**, 3945-3950 (2010).
- 199 Shah, M. *et al.* Multicenter phase II study of irinotecan, cisplatin, and bevacizumab in
patients with metastatic gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma. *Journal
of clinical oncology* **24**, 5201-5206 (2006).
- 200 Jatoi, A. *et al.* Bortezomib, Paclitaxel, and Carboplatin as a First-Line Regimen for
Patients with Metastatic Esophageal, Gastric, and Gastroesophageal Cancer: Phase II
Results from the North Central Cancer Treatment Group (N044B). *Journal of thoracic
oncology* **3**, 516-520 (2008).
- 201 Bang, Y.-J. *et al.* Trastuzumab in combination with chemotherapy versus
chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-
oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled
trial. *The Lancet* **376**, 687-697 (2010).
- 202 Lu, C. D., Altieri, D. C. & Tanigawa, N. Expression of a novel antiapoptosis gene,
survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric
carcinomas. *Cancer research* **58**, 1808-1812 (1998).
- 203 Meng, H., Lu, C., Mabuchi, H. & Tanigawa, N. Prognostic significance and different
properties of survivin splicing variants in gastric cancer. *Cancer letters* **216**, 147-155
(2004).
- 204 Da, C.-L. Significance and relationship between Yes-associated protein and survivin
expression in gastric carcinoma and precancerous lesions. *World Journal of
Gastroenterology* **15**, 4055 (2009).
- 205 Gu, C. *et al.* MicroRNA-212 inhibits the proliferation, migration and invasion of renal
cell carcinoma by targeting X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *Oncotarget*
8, 92119-92133, doi:10.18632/oncotarget.20786 (2017).
- 206 Dohi, T., Xia, F. & Altieri, D. C. Compartmentalized Phosphorylation of IAP by Protein
Kinase A Regulates Cytoprotection. *Molecular cell* **27**, 17-28,
doi:https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.004 (2007).
- 207 Arora, V. *et al.* Degradation of survivin by the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP)-
XAF1 complex. *Journal of biological chemistry* **282**, 26202-26209 (2007).
- 208 Zhu, X.-D. Expression of survivin in human gastric carcinoma and gastric carcinoma
model of rats. *World Journal of Gastroenterology* **9**, 1435 (2003).
- 209 Nakamura, M. *et al.* Survivin as a predictor of cis-diamminedichloroplatinum sensitivity
in gastric cancer patients. *Cancer science* **95**, 44-51 (2004).

- 210 Deng, H. *et al.* Significance of Survivin and PTEN expression in full lymph node-examined gastric cancer. *World journal of gastroenterology : WJG* **12**, 1013-1017 (2006).
- 211 Tsuburaya, A. *et al.* An anti-apoptosis gene, survivin and telomerase expression in gastric cancer. *Hepato-gastroenterology* **49**, 1150-1152 (2002).
- 212 Bury, J. *et al.* Vascular endothelial growth factor and survivin immunostaining in gastric adenocarcinoma. *Polski przeglad chirurgiczny* **84**, 341-347, doi:10.2478/v10035-012-0057-5 (2012).
- 213 Kim, M. A., Lee, H. E., Lee, H. S., Yang, H. K. & Kim, W. H. Expression of apoptosis-related proteins and its clinical implication in surgically resected gastric carcinoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **459**, 503-510, doi:10.1007/s00428-011-1150-6 (2011).
- 214 Ndubaku, C., Cohen, F., Varfolomeev, E. & Vucic, D. Targeting inhibitor of apoptosis proteins for therapeutic intervention. *Future Medicinal Chemistry* **1**, 1509-1525, doi:10.4155/fmc.09.116 (2009).
- 215 Dizdar, L. *et al.* Preclinical assesement of survivin and XIAP as prognostic biomarkers and therapeutic targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasia. *Oncotarget* **8**, 8369-8382 (2017).
- 216 Cheng, X. *et al.* Survivin inhibitor YM155 suppresses gastric cancer xenograft growth in mice without affecting normal tissues. *Oncotarget* **7**, 7096-7109 (2016).
- 217 Ghadimi, M. *et al.* Survivin is a viable target for the treatment of malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clinical Cancer Research* **18**, 2545-2557 (2012).
- 218 Satoh, T. *et al.* Phase I study of YM155, a novel survivin suppressant, in patients with advanced solid tumors. *Clinical Cancer Research* **15**, 3872-3880 (2009).
- 219 Tolcher, A. W. *et al.* Phase I and Pharmacokinetic Study of YM155, a Small-Molecule Inhibitor of Survivin. *Journal of Clinical Oncology* **26**, 5198-5203, doi:10.1200/JCO.2008.17.2064 (2008).
- 220 Wang, D.-G. *et al.* Anti-tumor activity of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) inhibitor embelin in gastric cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry* **386**, 143-152 (2014).
- 221 Tong, Q. S. *et al.* Downregulation of XIAP expression induces apoptosis and enhances chemotherapeutic sensitivity in human gastric cancer cells. *Cancer gene therapy* **12**, 509-514, doi:10.1038/sj.cgt.7700813 (2005).
- 222 Condon, S. M. *et al.* Birinapant, a Smac-Mimetic with Improved Tolerability for the Treatment of Solid Tumors and Hematological Malignancies. *Journal of medicinal chemistry* **57**, 3666-3677, doi:10.1021/jm500176w (2014).
- 223 Benetatos, C. A. *et al.* Birinapant (TL32711), a bivalent SMAC mimetic, targets TRAF2-associated cIAPs, abrogates TNF-induced NF-kappaB activation, and is active in patient-derived xenograft models. *Molecular cancer therapeutics* **13**, 867-879, doi:10.1158/1535-7163.mct-13-0798 (2014).
- 224 Krieg, A. *et al.* Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. *British journal of cancer* **86**, 737-743 (2002).
- 225 Mahotka, C. *et al.* Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. *International Journal of Cancer* **100**, 30-36, doi:doi:10.1002/ijc.10450 (2002).
- 226 Dizdar, L. *et al.* Survivin and XIAP expression in distinct tumor compartments of surgically resected gastric cancer: XIAP as a prognostic marker in diffuse and mixed type adenocarcinomas. *Oncology letters* **14**, 6847-6856, doi:10.3892/ol.2017.6999 (2017).

Danksagung

Ich möchte mich bei allen Bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Dissertation unterstützt und motiviert haben. Danke für die Begleitung auf diesem Pfad und für jeden individuellen sowie wertvollen Beitrag.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Andreas Krieg für die Möglichkeit, in der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie der Uniklinik Düsseldorf promovieren zu dürfen und die Bereitstellung des interessanten und durchdachten Promotionsthemas. Ich danke ihm für seine Geduld, die wertvolle Unterstützung und seinen Einsatz sowie fachliche und menschliche Kompetenz. Vor allem möchte ich mich für seine passenden Worte zum richtigen Zeitpunkt, die mich wieder auf Kurs gebracht haben, bedanken.

Ein großes Dankeschön gebührt meinem Co-Betreuer Dr. med. Levent Dizdar, der mich über den ganzen Zeitraum der Promotion begleitet hat und trotz seines anspruchsvollen Arbeitsalltags, die Zeit für meine Anliegen fand. Danke für die fachliche und menschliche Kompetenz und für die großartige Hilfe bei Planung, Durchführung sowie Auswertung der Promotion.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Familie für den Rückhalt und den Zuspruch, den sie mir schenken und dass sie immer mein „Anker“ sind. Insbesondere möchte ich hier meiner Schwester Marcela danken, die mich mit ihrer wissenschaftlichen und empathischen Kompetenz unterstützte und jederzeit mit Rat und Tat für mich da war. Ich danke Marc D. für seine Geduld und Toleranz. Ebenso danke ich meiner Mutter, die mich während des gesamten Studiums mit allen ihr zur Verfügung stehenden Mitteln unterstützte und mich meinen Weg zweifelsfrei gehen ließ.

Zuletzt danke ich Claus H., der zum richtigen Zeitpunkt in mein Leben trat und den Mut hatte, mir meine Verirrungen zu verdeutlichen und die Umkehrung und Klärung dieser ermöglichte. Danke für deinen unermüdlichen Einsatz und deine Energie. Danke für die klaren Worte und die Darstellung der Realität. Durch dich ist der Abschluss der Arbeit zu dieser Realität geworden.