

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral-, und Kinderchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Expression sowie prognostische und therapeutische Bedeutung der IAP-
Mitglieder Survivin und XIAP in gastroenteropankreatischen
neuroendokrinen Neoplasien

Dissertation

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

vorgelegt von
Kira Anika Oesterwind
(2020)

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

gez.:

Dekanin/Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Andreas Krieg

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Matthias Schott

Was wir wissen, ist eine Träne - was wir nicht wissen, ein Ozean.

Ich widme diese Arbeit meinen Großeltern, meiner Mutter und meiner Schwester, die mich immer von ganzem Herzen unterstützt haben und Dwight, ohne dich hätte ich die letzten Meter dieser Reise niemals geschafft.

Teile dieser Arbeit wurden in folgendem Paper publiziert:

Dizdar L, Oesterwind KA, Riemer JC, Werner TA, Mersch S, Möhlendick B, Schütte SC, Verde PE, Raba K, Topp SA, Stoecklein NH, Esposito I, Knoefel WT, Krieg A. Preclinical assesement of survivin and XIAP as prognostic biomarkers and therapeutic targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasia. *Oncotarget*. 2017 Jan 31;8(5):8369-8382.

Zusammenfassung

Gastroenteropankreatische (GEP) neuroendokrine Karzinome (NEC) sind durch schnelles Tumorwachstum, frühzeitige Metastasierung und eine hohe Resistenz gegen konventionelle Chemotherapeutika gekennzeichnet und stellen den biologisch aggressivsten Subtyp der neuroendokrinen Neoplasien (NEN) des Gastrointestinaltraktes dar. Bislang existieren nur sehr wenige klinische Daten zur Behandlung von Patienten und die Tumorbiologie dieser seltenen Malignome ist kaum erforscht. Die extrem schlechte Prognose der Patienten mit GEP-NECs macht jedoch deutlich, dass die Etablierung neuer Therapiestrategien sowie ein besseres biologisches Verständnis dieser Erkrankung dringend erforderlich sind. Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, zu analysieren, ob die Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP)-Familienmitglieder Survivin und XIAP als Zielstrukturen für die Etablierung molekular ausgerichteter Behandlungsansätze bei Patienten mit GEP-NECs genutzt werden können. Hierzu untersuchten wir zunächst mittels immunhistochemischer Färbungen die Expression der beiden Proteine in Gewebeproben aus GEP-NEN. Anschließend analysierten wir die Auswirkungen einer pharmakologischen Survivin- beziehungsweise XIAP-Inhibition in unseren GEP-NEC Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2. Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass die Survivinexpression in GEP-NEN eng mit dem proliferationsbasierten Grading assoziiert ist, wobei die höchsten Expressionslevel in schlecht differenzierten NECs erreicht wurden. Unsere in-vitro Experimente liefern darüber hinaus erste Hinweise darauf, dass Survivin in der Entwicklung der GEP-NECs eine entscheidende Rolle spielt, da es an der Regulation wichtiger zellulärer Mechanismen wie Proliferation und Apoptose beteiligt ist. Insbesondere Survivin scheint daher eine potentielle Zielstruktur für die Therapie von GEP-NEC zu sein. Unter von uns getesteten pharmakologischen IAP Antagonisten erwies sich der Survivin-Antagonist YM155 als vielversprechendster Kandidat für eine klinische Anwendung, da er in vitro eine beeindruckende Wirksamkeit demonstrierte. Angesichts der ausgeprägten Effektivität dieses *small molecule* Survivin-Inhibitors in unseren Experimenten scheint die Einbeziehung von Patienten mit fortgeschrittenen GEP-NECs in klinische Studien, welche die Wirksamkeit von YM155 untersuchen, als gerechtfertigt.

Summary

Neuroendocrine gastroenteropancreatic carcinoma (GEP-NEC) are characterized with rapid tumor growth, early metastasis and high chemo-resistance. They are the most aggressive subtype of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasia (GEP NEN) and their prognosis remains poor. Until now, there is not much knowledge about their tumor biology and clinical data for better treatment options is missing. Therefore, we see the need to improve our understanding of this rare tumor entity and establish new treatment strategies.

The Inhibitor of Apoptosis Protein (IAP) family achieved a lot of attention during the past years in cancer research. The aim of this work was to determine, if the IAP family members Survivin and XIAP can be used for targeted therapies in GEP-NEC or as a prognostic factor in GEP-NEN in general. Therefore, we analyzed the expression of Survivin and XIAP in GEP-NEN tissue slides by immunohistochemistry. In a second step we inhibited Survivin and XIAP pharmacologically in two GEP-NEC cell lines that were established in our laboratory before, NEC-DUE1 and NEC-DUE2.

We found a strong association of a high Survivin expression with the proliferation based grading: the highest expression of Survivin was found in the poor differentiated GEP-NECs. In our *in vitro* experiments, we could show that Survivin is involved in the regulation of proliferation and apoptosis in the tested cell lines. Therefore, Survivin seems to play a crucial role in the development of the GEP-NECs. The small molecule Survivin antagonist YM155 was the most promising agent we tested in this work for a clinical use, because we could show an impressive effect *in vitro*. We think that YM155 should be further investigated in clinical studies for patients with GEP-NEC in an advanced stage. It still needs to be clarified, if a monotherapy with YM155 could improve the prognosis of patients with GEP-NEC or if a combination with already established chemotherapy is needed. This should be investigated in future preclinical and clinical trials.

Abkürzungsverzeichnis

AVPI	Aminosäuresequenz Alanin, Valin, Prolin, Isoleucin
BIR	<i>Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Protein Repeat</i>
BIRC	<i>BIR containing</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
bp	<i>base pairs/Basenpaare</i>
BrdU	Bromodeoxyuridin/ <i>5-bromo-2'-deoxyuridine</i>
CARD	<i>Caspase Recruitment Domain</i>
cDNA/S	<i>copyDesoxyribonucleinAcid/Säure</i>
cIAP1	<i>Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1</i>
cIAP2	<i>Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2</i>
C(T)	<i>Threshold Cycle</i>
DD	<i>Death Domain</i>
DAPI	4', 6- Diamidino-2-Phenylindol
DED	<i>Death Effector Domain</i>
DNA/DNS	<i>dexoxyribonuclein-acid/Desoxyribonukleinsäure</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dH₂O	Destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	<i>Dulbeccos Phosphate Buffered Saline</i>
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
ENETS	<i>European Neuroendocrine Tumor Society/Europäische Vereinigung für neuroendokrine Tumoren</i>
Ex	Exon
FADD	<i>Fas associated Death Domain containing Protein</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphat Dehydrogenase

GE	gastroenteral
GEP	gastroenteropankreatisch(e)
GEP-NEC	<i>Gastroenteropankreatic Neuroendocrine Carcinoma/</i> gastroenteropankreatische neuroendokrine Karzinome
HE	Haematoxylin-Eosin (Färbung)
HIAP	<i>Human Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPF	<i>High Power Field</i>
HPV	Humanes Papillomavirus
HSV	Herpes simplex Virus
HRP-linked	<i>Horseradish – Peroxidase-linked</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
IC₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
ILP1	<i>Inhibitor of Apoptosis like Protein 1</i>
ILP2	<i>Inhibitor of Apoptosis like Protein 1</i>
IRS	Immunreaktiver Score
kDa	Kilo-Dalton
KIAP	<i>Kidney Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
LK	Lymphknoten
LRR	<i>Leucin Rich Repeat</i>
M4N	<i>Tetra-O-methyl Nordihydroguaiaretic Acid</i>
MIHA	<i>Mammalian Inhibitor of Apoptosis Protein A</i>
MIHB	<i>Mammalian Inhibitor of Apoptosis Protein B</i>
MIHC	<i>Mammalian Inhibitor of Apoptosis Protein C</i>
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
ML-IAP	<i>Melanoma Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
mRNA	<i>messengerRibonucleinAcid</i>

MW	<i>molecular weight</i>
NACHT	Domäne, die in <u>NAIP</u> , <u>CIITA</u> (<i>major histocompatibility complex class II activator</i>), <u>HET-E</u> (Genprodukt des HET-Gens in Pflanzen), <u>TP1</u> (<i>Telomerase-Associated Protein 1</i>) vorkommt
NAIP	<i>Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein</i>
NEN	Neuroendokrine Neoplasien
NET	Neuroendokrine Tumoren
NGA	<i>Nordihydroguaiaretic Acid</i>
UBC	<i>Ubiquitin conjugating</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer/Union for international cancer control</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> /Polymerase-Ketten-Reaktion
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1
PP	Pankreatisches Polypeptid
PRRT	Peptid-Rezeptor-gesteuerte Radiotherapie
RIPA	<i>Radio Immunoprecipitation Assay</i>
RING	<i>Really interesting new Gene</i>
RMPI	Rosewell Parc Memorial Institute
RNA	<i>ribonucleinacid</i> /Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat
SMAC	<i>Second mitochondria-derived Activator of Caspases</i>
SVV	Survivin
TBS-T	<i>Tris buffered saline with tween</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMA	<i>Tissue Micro Array</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
Ts-IAP	<i>Testis specific Inhibitor of Apoptosis Protein</i>

TP1	<i>Telomerase associated Protein 1</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNM	<i>tumour, lymph nodes, metastasis</i> , Klassifikation der UICC
TNMDGA	<i>Tetra-O-Methyl Nordihydroguaiaretic Acid</i>
Tris	Tris-aminomethan
VIP	Vasointestinales Peptid
VMAT	<i>Vesicular Monoamine Transporter</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
YM155	Sepantronium Bromid
XIAP	<i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i>
ZVAD FMK	Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Neuroendokrine Tumoren.....	1
1.2	Therapieoptionen bei neuroendokrinen Neoplasien.....	4
1.3	Zelltod in eukaryonten Zellen: Apoptose.....	5
1.4	Inhibitor of Apoptosis Proteins: IAP.....	6
1.4.1	Survivin (BIRC5).....	8
1.4.2	Survivin Inhibitoren: YM155 und M4N.....	11
1.4.3	XIAP	14
1.4.4	XIAP-Inhibitoren: GDC-0152, Birinapant.....	15
2	Zielsetzungen der Arbeit	17
3	Material und Methoden	18
3.1	Verwendete Materialien und Reagenzien.....	18
3.1.1	Geräte.....	18
3.1.2	Materialien.....	18
3.1.3	Reagenzien.....	19
3.1.4	Zelllinien.....	21
3.2	Methoden.....	22
3.2.1	Kultivierung der Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2.....	22
3.2.2	Behandeln der Zelllinien mit den <i>Compounds</i>	22
3.2.3	Western Blot.....	23
3.2.4	MTS-Assay.....	27
3.2.5	BrdU-Assay.....	27
3.2.6	Caspase-Assay.....	28

3.2.7 Immunfluoreszenzfärbung.....	29
3.2.8 Quantitative Real Time PCR.....	31
3.2.8.1 RNA-Isolation.....	32
3.2.8.2 Reverse Transkription.....	32
3.2.8.3 Durchführung der RT-PCR.....	33
3.2.8.4 Gelelektrophorese.....	33
3.2.8.5 Auswertung der RT-PCR mittels 2- $\Delta\Delta$ CT-Methode.....	34
3.2.9 Erfassung der Patientendaten für den Tissue Micro Array.....	34
3.2.10 Tissue Micro Array.....	35
3.2.11 Immunhistochemie und mikroskopische Auswertung.....	37
3.2.12 Statistische Auswertung des Tissue Micro Array.....	39
3.2.13 Statistische Auswertung der Zell-Assays.....	42
4 Ergebnisse.....	43
4.1 Expression von Survivin und XIAP in GEP-NEN: Tissue Micro Array.....	43
4.1.2 Korrelation klinisch pathologischer Daten mit der Expression von XIAP und Survivin in neuroendokrinen Tumoren.....	44
4.2 Expression der Inhibitor of Apoptosis Proteins in NEC-DUE Zelllinien.....	53
4.3 Effekt von YM155 und M4N auf die Proteinexpression von GEP-NEC Zelllinien.....	56
4.4 Analyse der Auswirkungen einer pharmakologischen Survivinhibition mit YM155 oder M4N auf die Viabilität, Proliferation und Apoptoseaktivität von GEP-NEC Zelllinien.....	59
4.5 Analyse der Auswirkungen einer pharmakologischen XIAP-Inhibition mit GDC-0152 und Birinapant auf die Viabilität von GEP-NEC Zelllinien.....	63
5 Diskussion.....	64
5.1 Die Inhibitor of Apoptosis Proteine Survivin und XIAP in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien.....	64

5.2 Survivin und XIAP als prognostische Marker in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien.....	65
5.3 Survivin in der Therapie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Karzinome.....	66
5.4 XIAP in der Therapie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Karzinome.....	68
6 Schlussfolgerung.....	70
7 Anhang: Verzeichnisse.....	71
7.1 Literaturverzeichnis.....	71
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	81
7.3 Tabellenverzeichnis.....	85

Danksagung

1 Einleitung

1.1 Neuroendokrine Tumoren

Mit einer Inzidenz von bis zu 2,51/100.000 gehören neuroendokrine Tumore (NET) zu den seltenen Neoplasien des gastroenteropankreatischen Systems (Niederle, Hackl et al. 2010). Das Interesse an ihnen ist jedoch in der letzten Zeit gestiegen, da eine Zunahme der Inzidenz verzeichnet werden kann (Niederle, Hackl et al. 2010). Das Ansteigen der Inzidenzrate könnte auf eine verbesserte endoskopische und stetig sensitivere Diagnostik zurückzuführen sein. In einer retrospektiven Studie aus den USA beschrieben Hassan et. al eine Assoziation zwischen vorbestehendem Diabetes mellitus und NET des Magens, insbesondere bei Frauen (Hassan, Phan et al. 2008). Die Autoren diskutieren daher, dass mit zunehmender Adipositas ein häufiger auftretender Diabetes mellitus besteht und es durch die Häufung des Diabetes mellitus somit auch zu einem erhöhten Auftreten von neuroendokrinen Neoplasien (NEN) kommt. Dies muss jedoch noch anhand von weiteren Studien belegt werden.

Neuroendokrine Neoplasien sind durch die Expression der neuroendokrinen Markerproteine Chromogonin A und Synaptophysin charakterisiert (Buffa, Rindi et al. 1987). Entwicklungsgeschichtlich stammen sie von Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems, welches sich aus dem Ektoderm der Neuralleiste oder dem Entoderm generiert (Welsch 2018). Die neuroendokrinen Tumore lassen sich nach ihrer Lokalisation weiter in gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien („GEP-NEN“) und anderweitig lokalisierte Tumore einteilen. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die GEP-NEN.

Im Jahr 2000 wurde von der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, kurz WHO) die Klassifikation nach gut- und schlecht differenzierten neuroendokrinen Neoplasien erweitert. Diese unterschied nun zwischen Tumoren und Karzinomen (groß- und kleinzellige Karzinome).

Das *Grading* der neuroendokrinen Neoplasien erfolgt seit 2010 nach der dann aktualisierten WHO-Klassifikation (Bosman 2010): Für das *Grading* ist das Proliferationsverhalten der Tumore entscheidend. Dies wird durch den Proliferationsindex mit der Ki67-Expression in % beschrieben und gliedert sich in G1 bis G3 Tumore (siehe Tabelle 1). Weitere Faktoren wie Tumorgröße, Progression, Lage

und Gefäßinvasion werden durch die jeweilige TNM-Klassifikation (Tumorklassifikationssystem nach Tumor, Nodus/Lymphknoten und Metastasierung eingeteilt) beschrieben. Diese unterscheidet sich je nach Ursprungsorgan.

In Tabelle 1 ist die aktuelle WHO-Klassifikation (WHO = World Health Organisation) der neuroendokrinen Neoplasien nach Bosman (Bosman 2010) zusammengefasst.

Besonders die schlecht differenzierten neuroendokrinen Karzinome (NEC) besitzen eine schlechte Prognose und es wurde bisher keine zufriedenstellende Behandlungsstrategie etabliert.

Tabelle 1: WHO Klassifikation nach Bosman (Bosman 2010)

		Ki67-Index in %	Mitosen pro 10 HPF
G1	Neuroendokriner Tumor (entspricht Carcinoid)	<2	2
G2	Neuroendokriner Tumor	3-20	2-20
G3	Neuroendokrines Karzinom (groß- oder kleinzellig)	>20	>20

Man differenziert weiter zwischen hormonell aktiven Tumoren und sogenannten klinisch stummen, nicht Hormon-sezernierenden Tumoren. Hormonell aktive Tumore werden häufig durch eine *Flush*-Symptomatik und eine durch das jeweilige sezernierte Hormon verursachte Klinik auffällig (Schott, Kloppel et al. 2011). Dies geschieht häufig auch erst nach der Manifestierung von Lebermetastasen, da dann die Sekretionsprodukte den Pfortaderkreislauf umgehen und direkt in den Blutkreislauf gelangen können (Lehnert 1997). Die Neoplasien werden dann auch nach dem Sekretionsprodukt, beispielsweise als Insulinom oder Gastrinom, betitelt (Schott, Kloppel et al. 2011).

Bekannte Syndrome sind zum Beispiel das Zollinger-Ellison-Syndrom bei erhöhter Gastrin-Sekretion. Dies äußert sich klinisch über die vermehrte Säuresekretion in

peptischen Ulzera, Diarrhoen sowie Refluxbeschwerden. Das Verner-Morrison-Syndrom entsteht bei erhöhter Sekretion des vasoaktiven intestinalen Peptids, kurz VIP und ist charakterisiert durch eine Achlorhydrie, wässrige Diarrhoen und eine Hypokaliämie. Das Insulinom sezerniert vermehrt Insulin und wird symptomatisch durch rezidivierende Hypoglykämien, die gut auf Glucosegabe ansprechen (Rinke A. 2014). Weiterhin zeigt diese Gruppe von gut differenzierten, Hormon-sezernierenden neuroendokrinen Tumoren weitgehend einen benignen Charakter, während die entdifferenzierten, neuroendokrinen Karzinome mit einer sehr schlechten Prognose einhergehen (Delle Fave, O'Toole et al. 2016).

Eine Übersicht über die Hormon-sezernierenden neuroendokrinen Neoplasien des Gastrointestinaltraktes und ihre jeweiligen Leitsymptome findet sich im Folgenden tabellarisch dargestellt (modifiziert nach Rinke, Arnold, 2014 (Rinke A. 2014)).

Tabelle 2: Übersicht neuroendokrine Tumore, modifiziert nach Rinke et al.

Lokalisation	Sezerniertes Hormon	Typische Leitsymptomatik
Gastrointestinaltrakt		
Magen		
Duodenum	evt. Gastrin	evt. Zollinger-Ellison-Syndrom
Jejunum		ggf. Karzinoid-Symptomatik
Ileum		ggf. Karzinoid-Symptomatik
Kolon		
Rektum		
Pankreas		
Insulinom	Insulin	Whipple-Trias: Hypoglykämien und Symptomatik, Besserung auf Kohlenhydrataufnahme
PPom	Pankreatisches Polypeptid	
VIPom	Vasoaktives intestinales Peptid	Verner-Morrison-Syndrom
Gastrinom	Gastrin	Zollinger-Ellison-Syndrom
Somatostinom	Somatostatin	

1.2 Therapieoptionen bei neuroendokrinen Neoplasien

Zurzeit ist die Therapie der Wahl bei GEP-NEN die chirurgische Resektion sowie die medikamentöse Therapie mit Chemotherapeutika (Arnold, Rinke et al. 2005). Die Therapie sollte nach den Empfehlungen der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) (Delle Fave, O'Toole et al. 2016, Falconi, Eriksson et al. 2016, Falconi, Eriksson et al. 2016, Garcia-Carbonero, Sorbye et al. 2016, Niederle, Pape et al. 2016, Pape, Niederle et al. 2016, Pavel, O'Toole et al. 2016, Ramage, De Herder et al. 2016, Garcia-Carbonero, Rinke et al. 2017, Perren, Couvelard et al. 2017) erfolgen, die regelmäßig in Konferenzen aktualisiert werden (Akerstrom, Falconi et al. 2009).

Ebenfalls ist die Behandlung von Patienten in speziellen Zentren empfohlen, da es sich noch immer um seltene Tumore handelt und sich die sehr differenzierte Behandlung an der zuvor erläuterten Einteilung und Lokalisation der Tumore orientiert. Bei den G1 und G2-Tumoren liegt bei Diagnosestellung meist ein lokalisierter Befund vor. Hier ist die endoskopische oder chirurgische Resektion die Therapie der Wahl. Im metastasierten und inoperablen Tumorstadium kann bei Somatostatin-Rezeptor exprimierenden Tumoren eine Peptid-Rezeptor-gesteuerte Radiotherapie (PRRT) indiziert sein, die gezielt an den Somatostatin-Rezeptoren der neuroendokrinen Zellen ansetzt. Über ein Somatostatin-Analogon wird eine Strahlenquelle nach intrazellulär eingeschleust. Diese führt dann über Entstehung von freien Radikalen zu DNA-Schäden und wirkt somit antiproliferativ. Ebenfalls werden die Radiofrequenzablation von Metastasen, interventionelle Embolisationstechniken und Chemotherapeutika eingesetzt (Anlauf, Gerlach et al. 2011). Die 10-Jahres-Überlebensrate liegt bei den G1 und G2-Tumoren bei bis zu 90% im lokalisierten Stadium und bei bis zu 50% im metastasierten Stadium (Pape, Berndt et al. 2008).

Bei neuroendokrinen Karzinomen empfehlen die aktuellen Leitlinien in nicht metastasierten Stadien eine onkologische Tumorresektion mit adjuvanter Chemotherapie (Strosberg, Halfdanarson et al. 2017). Leider sind jedoch bis zu 70% der neuroendokrinen Karzinome bereits bei Diagnosestellung metastasiert (Niederle, Hackl et al. 2010). In diesen fortgeschrittenen Stadien wird aktuell eine palliative Chemotherapie mit Etoposid in Kombination mit Cisplatin empfohlen (Strosberg, Halfdanarson et al. 2017). Die Prognose von Patienten mit gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Karzinomen ist schlecht. Das mittlere Überleben liegt bei bereits

erfolgter Fernmetastasierung bei ca. 11 Monaten, bei lokalisierter Erkrankung bei 38 Monaten. (Sorbye, Welin et al. 2013, Sorbye, Strosberg et al. 2014)

Angesichts dieser schlechten Prognose wird deutlich, dass dringend neue Behandlungsansätze für die Therapie der biologisch aggressiven gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Karzinome benötigt werden.

1.3 Zelltod in eukaryonten Zellen: Apoptose

Man unterscheidet beim Zelltod von eukaryonten Zellen die Nekrose und die Apoptose (Kerr, Wyllie et al. 1972). Die Apoptose wird als ein geplanter Untergang von Zellen beschrieben, in der verschiedene Vorgänge ablaufen, die unter physiologischen Bedingungen schließlich zur Gewebemöostase beitragen. Die Apoptose ist per definitionem ein kontrollierter Zelltod ohne begleitende Entzündungsreaktion, während die Nekrose den Zelltod mit begleitender Entzündungsreaktion beschreibt.

Bei der Apoptose beginnt das Sterben der Zelle mit der Kondensation des Chromatins. Anschließend werden Vesikel von der Zellmembran gebildet, diese werden auch als *Dead bodies* bezeichnet. Der Zellkern nimmt zunächst an Größe ab und wird dann in einzelne Fragmente geteilt. Anschließend werden die abgeschnürten Vesikel, auch als Apoptosekörperchen bezeichnet, von Phagozyten wie Makrophagen und Granulozyten aufgenommen und abgebaut. Ein zentrales Element zur Aktivierung der Apoptose sind die Caspasen. Es sind elf humane Caspasen beschrieben. Diese Enzyme sind Cysteinyl-Aspartat-Proteasen, die häufig zunächst als inaktive Procaspasen in der Zelle zu finden sind. Sie werden durch limitierte Proteolyse, Dimerisierung und Multimerisierung aktiviert. Die Caspasen selbst teilt man ein in Initiator- und Effektor- sowie die proinflammatorischen Caspasen. Zu den Initiatorcaspasen gehören Caspase -2, -8, -9 und -10, diese beginnen die Apoptose sowohl über den intrinsischen als auch den extrinsischen Weg. Die Effektorcaspasen Caspase -3, -6 und -7 werden durch die Initiatorcaspasen aktiviert. Dies geschieht ausschließlich durch limitierte Proteolyse. Die inflammatorischen Caspasen sind nicht direkt an der Apoptose beteiligt, daher wird hier nicht näher auf sie eingegangen. Die Aktivierung der Apoptose kann über den extrinsischen und den intrinsischen Weg erfolgen. Der extrinsische Weg wird über

extrazelluläre Rezeptoren vermittelt, während der intrinsische Weg primär im Mitochondrium beginnt.

Für den extrinsischen Weg docken proapoptotische Liganden aus der TNF-Superfamilie wie TNF- α (tumor necrosis factor α), Fas/CD95-Ligand und TRAIL (*TNF-related apoptosis inducing ligand*) an dafür spezifische Rezeptoren auf der Zelle an. An diesen Rezeptoren (TNF-R1, Fas-Rezeptor, TRAIL-R1 und 2) befinden sich auf der intrazellulären Seite des Rezeptors die sogenannten "*death domains*", kurz DD. An die intrazelluläre Domäne der Todesrezeptoren bindet nun das "*fas associated death domain containing protein*", kurz FADD. Die Procaspase-8 besitzt ebenfalls einen Proteininteraktionspunkt, die "*death effector domain*", kurz DED. Die DED bindet an FADD und damit bildet sich ein Polymer aus Procaspase-8 und dem Rezeptor. Dies bezeichnet man als "*death-inducing-signaling-complex*". Dieser setzt die Procaspase-8 zur aktiven Caspase-8 um. Diese aktiviert nun die Effektorcaspasen, welche zum proteolytischen Abbau von zelleigenen Proteinen wie Actin und Laminin zuständig sind.

Beim intrinsischen Weg führen Viren oder oxidativer Stress über eine Erhöhung der Permeabilität der mitochondrialen Membranen zu Freisetzung von proapoptotischen Stoffen. Hierzu gehören zum Beispiel "*second mitochondria derived activator of caspases*", kurz SMAC und Cytochrom C. Diese führen über weitere Prozesse zur Bildung des sogenannten Apoptosoms. Es kommt zur Dimerisierung der Caspase-9, welche nach dieser Aktivierung wiederum die Effektorcaspasen aktiviert. SMAC hemmt antiapoptotisch wirkende Mitglieder der Familie der Inhibitor of Apoptosis Proteine (IAPs), sodass bei Aktivierung von SMAC die Hemmung der Caspasen aufgehoben wird. (Sorbye, Strosberg et al. 2014). XIAP ist hierbei das einzige IAP, welches die Caspasen direkt inhibiert (Sorbye, Welin et al. 2013).

1.4 Inhibitor of Apoptosis Proteins: IAP

Die Inhibitor of Apoptosis Proteine (IAPs) sind eine Gruppe von Proteinen, die in den frühen 90er Jahren erstmals beschrieben wurden. Sie sind charakterisiert durch die sogenannten *BIR-Repeats*. BIR steht für Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Repeat, da die Proteingruppe erstmalig bei den Baculoviridae beschrieben wurde (Zhou, Du et al.

2005, Perren, Couvelard et al. 2017). Den IAPs wird eine Hemmung der Apoptose als führende Rolle zugeschrieben, mittlerweile hat man jedoch festgestellt, dass ihre Mitglieder teilweise auch andere Funktionen im Rahmen der Zellentwicklung sowie im Zellzyklus übernehmen. Ebenfalls sind sie an der Metastasierung von Tumoren beteiligt.

Die BIR-Domäne ist verantwortlich für die Bindung der Caspasen. Hierüber erfolgt eine direkte Hemmung (zum Beispiel XIAP) der Caspasen. Zudem kann über die RING-Domäne eine Förderung der Ubiquitinierung und damit des proteasomalen Abbaus der Caspasen (zum Beispiel cIAP1, 2) folgen. Beides induziert schließlich die Inhibierung der Caspasefunktion und somit die Hemmung der Apoptose (Zhu, Li et al. 2019).

Zu den IAPs gehören Survivin, XIAP, cIAP1, cIAP2, ILP2, ML-IAP, NAIP, sowie Bruce. Die weiteren Bezeichnungen für die jeweiligen Proteine finden sich in Abbildung 1 (modifiziert nach Eckelman et al., 2006).

Während XIAP, cIAP1 und cIAP2 in nahezu allen humanen Zellen exprimiert sind (Giaccone, Zatloukal et al. 2009), ist Survivin nur in fetalem Gewebe sowie in Tumorgewebe exprimiert (Ambrosini, Adida et al. 1997). Dies hat es bereits früh in den Vordergrund für eine gezielte Tumorthherapie gesetzt. Im Folgenden werden der Aufbau und die Funktion von Survivin und XIAP genauer erläutert, da diese Proteine in der vorliegenden Arbeit vorwiegend untersucht wurden.

Grabowski et. al. konnten bereits eine erhöhte Expression -besonders von nukleärem Survivin- in NET nachweisen und diese mit einer schlechteren Prognose in Verbindung bringen (Grabowski, Griss et al. 2005). In dieser Arbeit wurde die aktuelle WHO-Klassifikation jedoch noch nicht berücksichtigt und die Analyse beschränkte sich auf ein kleines Patientenkollektiv, sodass eine erneute Aufarbeitung der Thematik sinnvoll erscheint. Dies wurde durch diese Arbeit umgesetzt.

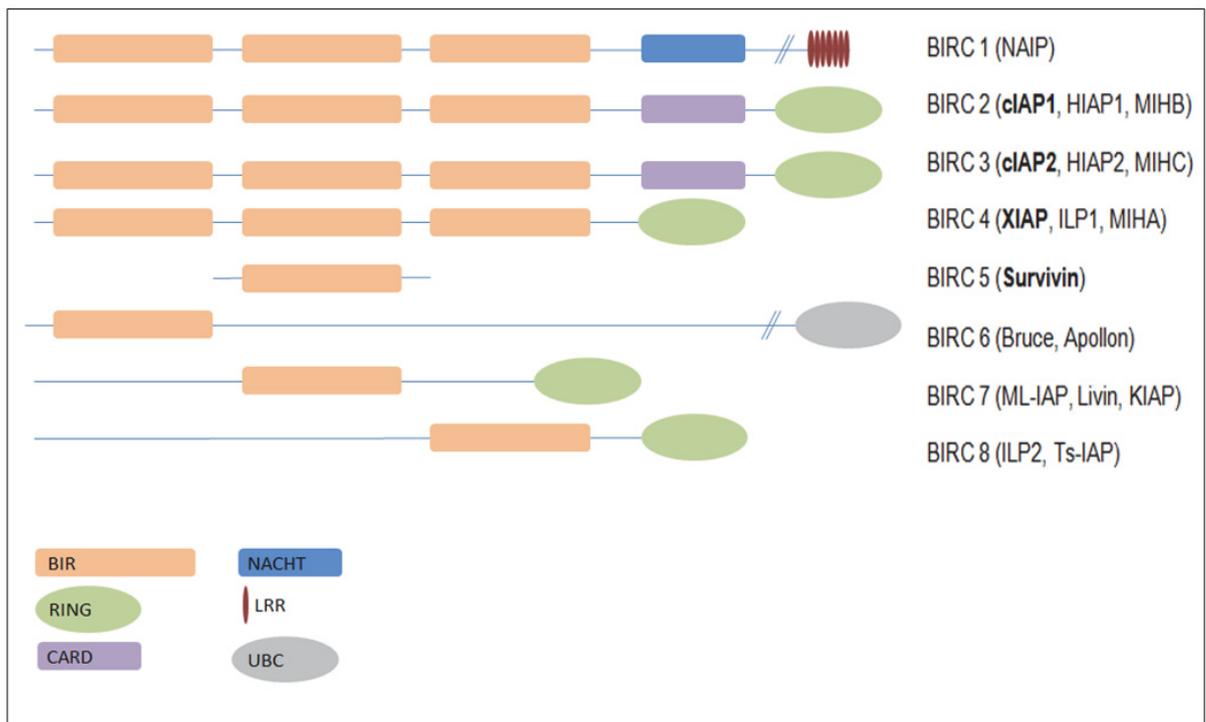


Abb. 1: Aufbau der IAPs, modifiziert nach Eckelman et Al. (2006) Abkürzungen: BIRC 1-8: Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Protein Repeat Containing 1-8; NAIP: Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein; cIAP1 und 2: Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 und 2; HIAP 1 und 2: Human Inhibitor of Apoptosis Protein 1 und 2, MIHA, MIHB, MIHC: Mammalian Inhibitor of Apoptosis Protein Homolog A, B, C; XIAP: X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein; ILP 1 und 2: Inhibitor if Apoptosis like Protein 1 und 2; ML-IAP: Melanoma Inhibitor of Apoptosis Protein; KIAP: Kidney Inhibitor of Apoptosis Protein; Ts-IAP: Testis specific Inhibitor of Apoptosis Protein; NACHT: Domäne, die in NAIP, CITA (major histocompatibility complex class II activator), HET-E (Genprodukt des HET-Gens in Pflanzen), TP1(Telomerase-Associated Protein 1) vorkommt; RING: Really interesting new Gene, LRR: Leucin rich repeat, CARD: Caspase Recruitment Domain, UBC: Ubiquitin conjugating (Thomas A. Kufer 2005)

1.4.1 Survivin (BIRC5)

Die IAPs sind seit einigen Jahren in der Tumorforschung in den Vordergrund gerückt. 1997 wurde Survivin, welches durch das BIRC5-Gen kodiert wird, erstmals als Mitglied der IAPs charakterisiert (Ambrosini, Adida et al. 1997).

Survivin wird kodiert durch ein Gen mit drei Introns und vier Exons (Singh, Moody et al. 2018). Es ist ein Protein mit einer Größe von 16.5 Kilodalton (kDa), von dem bisher

sechs Spleißvarianten beschrieben sind (Briest, Wang et al. 2018). Es ist, wie auch in Abbildung 1 zu erkennen, das kleinste Protein aus der Familie der IAPs.

Survivin ist in nahezu allen bekannten humanen Krebsformen überexprimiert (Ambrosini, Adida et al. 1997, Lladser, Sanhueza et al. 2011). Weiterhin findet es sich in embryonalen Geweben, CD 34-positiven Progenitorzellen der Blutbildung, basalen Colonepithelien, der Plazenta sowie T-Zellen des Thymus. Es wird mit Tumorprogression, erhöhter Metastasierungsrate (Mehrotra, Languino et al. 2010) sowie Invasionsfähigkeit von verschiedenen Neoplasien in Verbindung gebracht (Knauer, Mann et al. 2007, Stauber, Mann et al. 2007).

Die Lokalisation des Proteins in der Zelle ist ausschlaggebend für die Funktion: Im Zellkern liegt Survivin meist als Homodimer vor (Verdecia, Huang et al. 2000) und wirkt so auf die Mitose. Im Zytosol liegt Survivin als Monomer vor und wirkt dann antiapoptotisch (Pavlyukov, Antipova et al. 2011). Die Umwandlung von Dimer zu Monomer findet im Zellkern statt. Es wurde ebenfalls mitochondrales Survivin beschrieben, welches ebenfalls mit der Apoptosehemmung in Verbindung gebracht wird (Dohi, Beltrami et al. 2004): Hier wurde eine Hemmung der Freisetzung von SMAC aus dem Mitochondrium durch Survivin beschrieben (Ceballos-Cancino, Espinosa et al. 2007). Andere Autoren berichten auch von einer direkten Hemmung des SMAC-Komplexes durch Survivin (Song, Yao et al. 2003).

Survivin spielt eine wichtige Rolle in der Zellteilung an verschiedenen sogenannten Checkpunkten der Mitose (Ambrosini, Adida et al. 1997, Lens, Vader et al. 2006, Jeyapakash, Klein et al. 2007). Hier interagiert es mit dem Spindelfaserapparat sowie dem Kinetochor-assoziierten chromosomalen *Passenger*-Komplex. Dieser spielt eine wichtige Rolle während der Spätphase der Mitose, Survivin interagiert hier unter anderem mit Borealin (Lens, Vader et al. 2006).

Wie genau Survivin zur Hemmung des Zelltodes beiträgt, wird diskutiert, es scheint jedoch keine direkte Hemmung der Caspasen vorzuliegen (Lladser, Sanhueza et al. 2011). Dohi et al. beschreiben eine Komplexbildung von XIAP und Survivin (Dohi, Okada et al. 2004). Dieser Komplex verhindert einerseits den Ubiquitin-gesteuerten Abbau von XIAP und stabilisiert so dieses Protein und hemmt andererseits direkt Caspase 9 (Abbildung 2). Alle drei BIR-Domänen von XIAP weisen Bindungsstellen für Survivin auf, hier vermuten die Autoren auch eine Beeinflussung der anderen

Interaktionspartner von XIAP, wie zum Beispiel SMAC und Caspase-3, -7 und -9 (Dohi, Okada et al. 2004).

Die Gruppe um Marusawa et al. fanden heraus, dass Survivin mit dem *Hepatitis B X-Interacting Protein* (kurz HBXIP) interagiert und der aus diesen beiden Proteinen entstandene Komplex ebenfalls direkt Caspase 9 hemmt (Marusawa, Matsuzawa et al. 2003). Auf HBXIP wurde die Arbeitsgruppe über ein Screening von *copyDNA* (cDNA) für Survivin-bindende Proteine aufmerksam (Marusawa, Matsuzawa et al. 2003). Die physiologische Funktion von HBXIP war vor dieser Arbeit noch nicht geklärt, nun wird vermutet, dass es als Co-Faktor von Survivin antiapoptotisch wirkt. Das Protein wurde erstmals 1998 als Hemmstoff des sogenannten X-Proteins des Hepatitis-B-Virus beschrieben und ist in nahezu allen humanen Geweben exprimiert (Melegari, Scaglioni et al. 1998).

Mehrotra et al. (Mehrotra, Languino et al. 2010) konnten zeigen, dass Survivin eine wichtige Rolle in der Migration von Tumorzellen und somit der Metastasierung und Invasion spielt: Es wurde in verschiedenen Karzinomzelllinien ein Survivin-*Knock-Down* durchgeführt, woraufhin die Zellen -signifikant weniger als die jeweilige Kontrollgruppe- durch ein Matrixgel migrierten. Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass XIAP und Survivin einen Komplex bilden, der wiederum NF-Kappa-B aktiviert. Dies fördert die Genexpression von migrationsfördernden Proteinen wie zum Beispiel Fibronectin und somit die Migrationsfähigkeit von Tumorzellen.

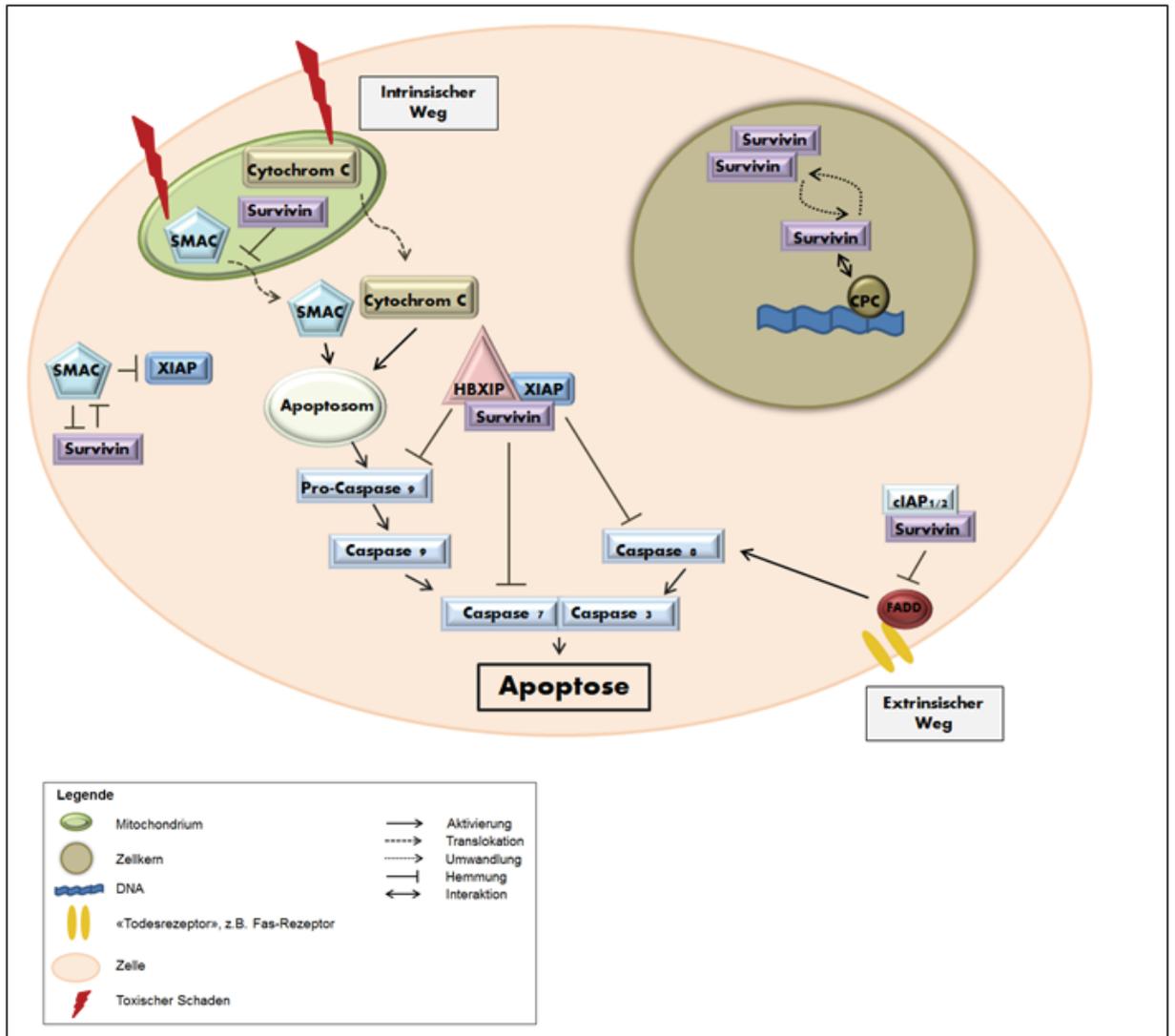


Abb. 2: Schematische, vereinfachte Darstellung der Vorgänge in der Zelle beim intrinsischen und extrinsischen Weg der Apoptose. Survivin und XIAP bilden mit HBXIP einen Komplex, der die Caspasen hemmt. Survivin wirkt zusätzlich im Zellkern durch Interaktion mit dem CPC. (Abkürzungen: SMAC: second mitochondria-derived activator of caspase, HBXIP: Hepatitis B Virus Interacting Protein, CPC: chromosomal passenger complex, XIAP: X-linked inhibitor of Apoptosis Protein, FADD: fas associated death domain containing protein, DNA: desoxyribonuclein acid). Abbildung modifiziert nach Wheatley et al., Martinez-Garcia et al. (Martinez-Garcia, Manero-Ruperez et al. 2019, Wheatley and Altieri 2019).

1.4.2 Survivin Inhibitoren: YM155 und M4N

Survivin kann im Sinne einer *Targeted Therapy* durch verschiedene Substanzen antagonisiert werden. Besondere Aufmerksamkeit erlangt haben in den letzten Jahren die beiden Survivin-Inhibitoren YM155 und M4N (Chen, Teng et al. 1998), (Nakahara,

Kita et al. 2007). Diese werden im folgenden Absatz kurz vorgestellt, da in der vorliegenden Arbeit Versuche mit ihnen durchgeführt wurden.

Im Jahre 2007 wurde erstmals das *small molecule* YM155 oder Sepatrobiumbromid beschrieben und seine Wirkung an Prostatakarzinomen evaluiert (Nakahara, Kita et al. 2007). YM155 ist ein Imidazolium-basiertes *small molecule*, welches in einem für Survivin spezifischen Luziferase-Gen-Promotor-Assay entdeckt wurde. YM155 (Sepantroniumbromid) ist somit ein Inhibitor des Promoters von Survivin, hemmt also dessen Transkription. YM155 bindet an die 269 bp-Region des Survivin-Promotors und hat geringe Auswirkung auf die Expression von anderen Proteinen (Cheng, Ling et al. 2012). Dies ist ein Erklärungsansatz dafür, dass das Molekül in den bisher durchgeführten Studien vergleichsweise geringe unerwünschte Wirkungen hat. Beispielsweise führt es nicht zu einem Gewichtsverlust, wie es für verschiedene Chemotherapeutika bekannt ist. Dies konnte ebenfalls in bereits erwähnter Studie zu Prostatakarzinomen nachgewiesen werden. Nakahara et al. beschrieben eine Dosis-abhängige Tumorsuppression in den Prostatakarzinomzellen (Nakahara, Kita et al. 2007). Zudem moduliert YM155 Sp1, einen Transkriptionsfaktor von Survivin und verhindert so die Expression von Survivin in verschiedenen humanen Neoplasien (Cheng, Ling et al. 2012).

In präklinischen Untersuchungen zeichnete sich der Survivin-Antagonist durch eine überzeugende Wirksamkeit bei zahlreichen verschiedenen Malignomen aus. In klinischen Phase I Studien überzeugte die Substanz darüber hinaus durch ein günstiges Sicherheitsprofil mit nur selten auftretenden unerwünschten Wirkungen (Tolcher, Mita et al. 2008, Satoh, Okamoto et al. 2009, Kelly, Thomas et al. 2013). In bislang durchgeführten klinischen Studien der Phase II zeigte sich jedoch eine nur begrenzte Effektivität von YM155 als Monotherapie, so dass aktuell die Wirksamkeit dieser Substanz auch im Rahmen von Kombinationstherapien mit anderen Chemotherapeutika erprobt wird (Nakahara, Kita et al. 2007, Satoh, Okamoto et al. 2009, Kelly, Thomas et al. 2013).

Auch M4N (Tetra-O-methyl Nordihydroguaiaretic Acid, TNMDGA) hemmt die Transkription von Survivin. M4N (auch bezeichnet EM-1421, Terameprecol) wurde 1998 erstmals in Studien zur antiviralen Aktivität von Nordihydroguaiaretischen Säuren beschrieben (Chen, Teng et al. 1998). M4N ist ein synthetisches Derivat der in der

Natur vorkommenden Nordihydroguaiaretischen Säure (englisch kurz NDGA). M4N blockiert direkt das Sp1-Protein. Dieses funktioniert als Zinkfingerprotein und bindet an die Promotorregion verschiedener Gene, was zu deren Transkription führt. Chen et al. untersuchten die Hemmung von verschiedenen Genen in HSV- und HIV-Viren (Herpes simplex Virus, Humanes Immundefizienzvirus) (Chen, Teng et al. 1998). Der Survivin-Promotor ist ebenfalls abhängig von Sp1 und somit kann M4N über eine Bindung von Sp1 die Transkription von Survivin hemmen. Dies wurde unter anderem an Glioblastom-Zelllinien nachgewiesen (Carlsen, Fazio et al. 2019). Nach Applikation von M4N konnte hier ein verminderter Mitose-Index, ein veränderter Zellzyklus sowie eine vermehrte Apoptose der Zellen nachgewiesen werden. Die Kombination mit Radiochemotherapie zeigte bei gleichzeitiger Applikation gute Effekte (Carlsen, Fazio et al. 2019).

M4N wird topisch in Phase I und II-Studien bereits bei der Behandlung von HPV (Humanes Papillomavirus)-positiven zervikalen intraepithelialen Neoplasien bei Frauen angewendet (Strosberg, Halfdanarson et al. 2017) und zeigt hier eine große lokale Wirkung bei geringer Resorption, führt also kaum zu systemischen Nebenwirkungen. Zudem konnte gezeigt werden, dass M4N im Mausmodell das Wachstum von verschiedenen humanen Tumoren hemmt (Cives and Strosberg 2018). Dies scheint jedoch teilweise Survivin-unabhängig über noch unklare Signalwege zu geschehen (Shah, Goldner et al. 2018).

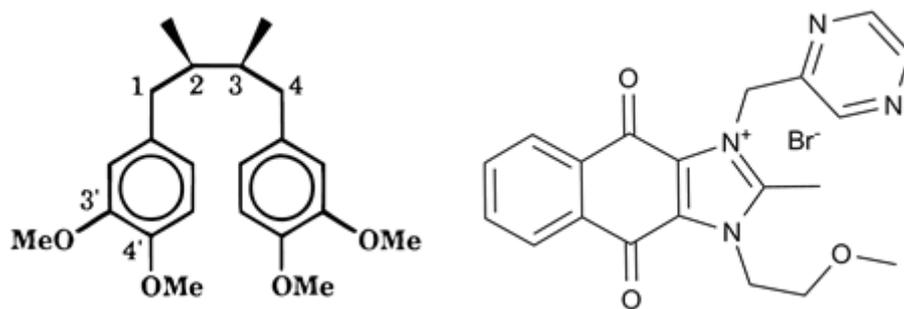


Abb. 3: Chemische Struktur M4N, YM155 (Hwu, Tseng et al. 1998, Go, Lim et al. 2019)

1.4.3 XIAP

Ebenfalls als bedeutsam zu werten ist das XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein), welches unter anderem synergistisch mit Survivin die Apoptose über direkte sowie indirekte Caspaseinhibition reguliert (Lu, Lin et al. 2007).

XIAP wird im Gegensatz zu Survivin in nahezu allen humanen Geweben exprimiert. Lediglich in Leukozyten im peripheren Blut konnte bisher keine Expression von XIAP nachgewiesen werden (Livak and Schmittgen 2001). Zudem wird XIAP für die Apoptoseresistenz von Nervenzellen sowie Kardiomyozyten verantwortlich gemacht (Potts, Vaughn et al. 2005, Vaughn and Deshmukh 2007).

Das Protein setzt sich aus 497 Aminosäuren zusammen und wird kodiert durch die Cq25-Region des X-Chromosoms. Es ist eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase und trägt so zum Abbau verschiedenster Proteine bei, indem es die Ubiquitinierung fördert (Zhu, Li et al. 2019). XIAP hemmt die Caspasen-3, -7 und -9 (Deveraux, Roy et al. 1998) direkt und bewirkt so eine Hemmung der Apoptose (Janson, Sorbye et al. 2010).

Dies geschieht über die BIR-Domänen BIR1, -2, und -3. Die Rolle von BIR 1 ist noch nicht abschließend geklärt. Lin et al. beschreiben eine Rolle in der Dimerisierung von XIAP (Lin, Huang et al. 2007). Dies scheint beispielsweise eine Rolle bei den *Mucosa associated lymphoid tissue* (MALT) -Lymphomen zu spielen (Zhou, Du et al. 2005, Lu, Lin et al. 2007): In diesen beiden Studien konnte gezeigt werden, dass BIR 1 die NF-Kappa-B-Aktivierung fördert, was wiederum mit einer Förderung der Migrationsfähigkeit und damit Malignität assoziiert wird.

Caspase 9 wird auf zwei verschiedene Arten durch BIR3 gehemmt: einerseits bindet BIR3 am N-Terminus der aktivierten Caspase-9 an das *IAP binding motif* (IBM), andererseits hemmt BIR3 die Dimerisierung der Caspase-9 durch Blockade der Dimerisierungs-Bindungsstelle (Zou, Yang et al. 2003, Zhu, Li et al. 2019). BIR 2 wirkt ebenfalls über eine Hemmung des IBM am N-Terminus der Caspasen-3 und -7. Gleichzeitig besitzt es einen *Linker*, der die beiden Caspasen direkt hemmt (Huang, Park et al. 2001).

XIAP bildet außerdem mit Survivin einen Komplex zur Hemmung der Caspase 9 (Dohi, Okada et al. 2004), wie bereits oben beschrieben und in Abbildung 2 illustriert.

Mehrotra et al. (Mehrotra, Languino et al. 2010) konnten zeigen, dass XIAP in einem Komplex mit Survivin die Invasionsfähigkeit von Tumorzellen steigert: so wurde die Zellinvasion in vivo in HCT116-Zellen bei einer homozygoten Deletion von XIAP vollständig gehemmt. XIAP-*Knock-Down*-Zellen migrierten weniger durch ein Matrixgel als die Kontrollgruppe. Zudem bildeten die XIAP-*Knock-Down* Zellen im Mausmodell weniger Metastasen aus. Hieraus schließen die Autoren, dass XIAP eine wichtige Rolle in der Metastasierung und Migration von Tumorzellen spielt.

Über die Beeinflussung der Permeabilität der Mitochondrienmembran nimmt XIAP ebenfalls Einfluss auf die Apoptose (Zhu, Li et al. 2019). Owens et al. konnten zeigen, dass XIAP über Translokation vom Zytosol in das Mitochondrium zur Freisetzung von SMAC und Cytochrom C beiträgt, was eine Apoptose-fördernde Wirkung bedeuten würde. Eine gleichzeitig Apoptose fördernde und hemmende Wirkung wird für viele Proteine diskutiert. Es wird angenommen, dass so eine Balance der Funktion in gesunden Zellen erhalten bleibt (Owens, Foster et al. 2010). Flanagan et al. postulieren, dass XIAP die Freisetzung von SMAC aus dem Mitochondrium hemmt (Lu, Lin et al. 2007), vermutlich verfügt das Protein tatsächlich über beide Wirkungen. SMAC ist ein direkter Inhibitor von XIAP, ebenfalls wird es über einen positiven Feedbackmechanismus von Caspase-3 gespalten. Dies konnte in Melanom-Zellen nachgewiesen werden (Li, Ma et al. 2007). So wird wiederum die Apoptose vorangetrieben.

1.4.4 XIAP-Inhibitoren: GDC-0152, Birinapant

Eine Art von Hemmstoffen von XIAP sind die SMAC-Mimetika. SMAC wird bei oxidativem Stress aus dem Mitochondrium freigesetzt und führt zur Aktivierung des intrinsischen Wegs der Apoptose (Abbildung 2). Es stellt einen natürlichen Hemmstoff von XIAP und Survivin dar (Song, Yao et al. 2003). Diese Hemmung findet über das AVPI-Tetrapeptid (AVPI steht für die Aminosäuresequenz aus Alanin, Valin, Prolin und Isoleucin) statt, dieses hemmt die IAPs an den jeweiligen BIR-Domänen (Song, Yao et al. 2003, Ceballos-Cancino, Espinosa et al. 2007).

Birinapant ist eines dieser SMAC-Mimetika, das zuvor unter dem Namen TL 32711 bekannt war. Es wurde unter anderem im in vitro Modell eine IAP-abhängige

Apoptoseaktivierung in Brustkrebszellen nachgewiesen (Allensworth, Sauer et al. 2013). Ebenfalls konnte in Melanomzelllinien eine TNF-alpha-abhängige Reduktion der Zellviabilität nachgewiesen werden. In vivo zeigte sich in der gleichen Studie im Mausmodell eine TNF-alpha-unabhängige Anti-Tumoraktivität durch Birinapant (Krepler, Chunduru et al. 2013).

Ein weiteres *small molecule* SMAC-Mimetikum ist GDC-0152, welches 2012 erstmals synthetisiert wurde (Flygare, Beresini et al. 2012). Es wurde in Analogie zum N-Terminus des Proteins SMAC synthetisiert und bindet an die BIR-3-Domäne von XIAP, cIAP1 und cIAP2 sowie an der BIR-Domäne von BIRC7.

Die Arbeitsgruppe, die das Molekül erstmalig synthetisierte, führte ebenfalls in vivo Versuche im Mausmodell durch und konnte eine Reduktion der Größe von aus Brustkrebszellen generierten Tumor-Xenografts erreichen (Flygare, Beresini et al. 2012).

In unserem Labor konnte durch beide SMAC-Mimetika in einem in vitro-Modell eine Sensitivierung von Schilddrüsenkarzinomzellen gegenüber einer TRAIL-induzierten Apoptose gezeigt werden (Werner, Nolten et al. 2018).

2 Zielsetzungen der Arbeit

GEP-NEC stellen den biologisch aggressivsten Subtypen der NEN des Gastrointestinaltraktes dar. Die Prognose dieser Erkrankung ist insgesamt schlecht. Das mittlere Überleben liegt bei lokalisierten Tumoren bei 38 Monaten, bei bereits erfolgter Metastasierung bei nur noch ca. 11 Monaten. Angesichts der sehr schlechten Prognose wird deutlich, dass dringend neue Behandlungsansätze zur Therapie dieser aggressiven Tumorerkrankung benötigt werden.

Mit Hilfe moderner Analyseverfahren ist es in den vergangenen Jahrzehnten gelungen, eine Vielzahl tumorspezifischer molekularer Veränderungen zu identifizieren, die einer gezielten medikamentösen Therapie zugänglich sind. Einige dieser sogenannten *Targeted Therapies* haben bereits Einzug in den klinischen Alltag gefunden und die Prognose von Krebspatienten zum Teil deutlich verbessert. Für die Behandlung gastroenteropankreatischer neuroendokriner Karzinome existieren derartige Therapiestrategien bislang jedoch noch nicht. Das Ziel unserer Forschung war es demnach, zielgerichtete Therapieansätze für die Behandlung gastroenteropankreatischer neuroendokriner Karzinome zu entwickeln.

Die IAPs Survivin und XIAP sind an der Regulation von für Krebszellen essentiellen biologischen Funktionen wie Proliferation, Apoptose und Metastasierung beteiligt und gelten als vielversprechende Zielstrukturen für Krebstherapien. Ziel der Arbeit war es, zu analysieren, ob die genannten Proteine auch bei Patienten mit GEP-NECs ein potentiell Ziel für eine *Targeted Therapy* darstellen.

Hierzu wurde im ersten Teil des Projekts ein großes Kollektiv von GEP-NEN Gewebeproben bezüglich der Expression von Survivin und XIAP mittels immunhistochemischer Färbungen analysiert. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Auswirkungen einer gezielten pharmakologischen Inhibition der IAPs Survivin und XIAP in zwei Zelllinien gastroenteropankreatischer neuroendokriner Karzinome untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Materialien und Reagenzien

3.1.1 Geräte

Tabelle 3: Auflistung der Geräte

Gerät	Herstellendes Unternehmen
Bio Photometer	Eppendorf
Criterion Blotter	BioRad
Forma 405	Thermo Electron Company
Hera Cell	Heraeus
Hera Safe KS	Heraeus
Heraeus Fresco 17 Zentrifuge	Heraeus
Infinite M200	Tecan
KS 250 basic	Ika Labortechnik
Mini-PROTEAN™ Tetra-Cell	BioRad
Pipetboy	Integra Biosciences
Pipetten	Eppendorf
PowerPac HC	BioRad
Sparkfree Laboratory Freezer	Thermo Electron Corporation
SU 1400	Sunlab
Thermostativ Waterbath WBS	Fired Electronic
Universal 30 RF	Hettich LABTechnology
VersaDoc Modell 400	BioRad
Wilovert A	Hund Wetzlar
Zählkammer	Neubauer
Manual Tissue Arrayer MTA-1	Beecher Instruments, Sun Prairie

3.1.2 Materialien

Die verwendeten Kunststoffartikel sowie Einwegartikel wurden von folgenden Unternehmen hergestellt: BD Biosciences, Eppendorf, Falcon, StarLab, Costar und BioOne.

3.1.3 Reagenzien

Tabelle 4: Auflistung Reagenzien, Hersteller

Reagenz/Lösung	Herstellendes Unternehmen
D-PBS	Gibco
RMPI with Glutamax	Gibco
FCS	Gibco
Trypsin EDTA	Gibco
YM155	Selleckchem
M4N	Selleckchem
GDC	Selleckchem
Birinapant	Selleckchem
DMSO	Sigma Aldrich
CellTiter 96 Aqueous one Solution Cell Proliferation Assay	Promega
ZVAD-FMK	Abcam
QIAamp DANN Blood Midi Kit	Qiagen
RNeasy Mini Kit Qiagen	Qiagen
RNase-Free DNase Set Qiagen	Qiagen
Ethanol	VWR Chemicals
Mercaptoethanol	Gibco
Nukleasefreies Wasser	Merck
RIPA-Puffer	Sigma
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche
BioRadDye-Puffer	BioRad
Laemmli-Puffer	BioRad
TEMED	Sigma
Precision Plus Protein WesternC (Leiter)	BioRad
Precision Strep Tactin-HRP	BioRad
Luminol Enhancer Solution	BioRad
Xylol	Merck
dH ₂ O	Gibco

Antibody diluent	Zytomed Systems
Trinatriumcitratdihydrat	Merck
PBS	Gibco
Tween20	Sigma
ZytoChem Plus HRP-DAB Kit	Zytomed
Mayers Hämalaun	Merck
Corbit-Balsam zum Eindeckeln	Merck
Liquid Blocker Super Pap Pen	MBT Brand
Bovine Serum Albumin Fraction (BSA)	Sigma
Milchpulver	Nestle
SDS (Sodiumdodekylsulfat)	Sigma
Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG Kit	Invitrogen

Tabelle 5: Verwendete Lösungen und Puffer und ihre Zusammensetzung

Lösungen, Puffer	Zusammensetzung
DAB	5 Tropfen DAB Chromogen in eine Flasche DAB Substrat
Retrieval Solution	10mM Natrium-Citrat-Puffer: 3mg Tri-Natriumcitrat-Dihydrat in 1L dH ₂ O
H ₂ O ₂ -PBS	3% H ₂ O ₂ in 1xPBS
BrdU labeling solution	1% BrdU labeling Reagenz mit 99% sterilem Medium
Anti-BrdU-POD-Stock solution	Anti-BrdU-POD in 1.1 ml dH ₂ O
Anti-BrdU-POD working solution	1% Anti-BrdU-POD stock solution, 99% Antibody diluent solution
Ponceaurot-Lösung	0.5g Ponceau S Pulver, 100 ml 5% Essigsäure

Puffer Westernblot:

Waschpuffer HRP	PBS mit 0.1% Tween 20
10xSDS Laufpuffer	250mM Tris, 1.9mM Glycin, 10g SDS in dH ₂ O
10x Transferpuffer	192mM Glycin, 25mM Tris
1x Transferpuffer	10% 10x Transferpuffer, 20% Methanol in dH ₂ O
10x TBS Waschpuffer	1.5M NaCl, 100mM Tris in dH ₂ O, pH 7.5
1x TBS-T Waschpuffer	1x TBS Puffer, 0.1% Tween
Blockierlösung	Milchpulver 5% in 1x TBS-T

3.1.4 Zelllinien

Es wurden zwei in unserem Labor als Primärzelllinien etablierte, neuroendokrine Karzinomzelllinien verwendet. Bei beiden Zelllinien handelt es sich um großzellige neuroendokrine Karzinome. Während NEC-DUE1 aus einer atypisch resezierten Lebermetastase -mit Primarius am gastroösophagealen Übergang- isoliert wurde, stammt NEC-DUE2 aus einer Lymphknotenmetastase mit Primärtumor an der rechten Kolonflexur. Beide Zelllinien stammen von zum Entnahmezeitpunkt 71-jährigen, männlichen Kaukasiern (Krieg et. al, 2014).

Tabelle 6: NEC-DUE Zelllinien: Herkunft, TNM, Status

Zelllinie	Organ/Entnahmeort	TNM	Status
NEC-DUE1	Magen/Lebermetastase	pT3 N1 L1 V1 G3	lebt
NEC-DUE2	Kolon/LK-Metastase	pT4a N2b M1a L1 V1 Pn1 G3	verstorben

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung der Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2

Die Zelllinien wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen in jeweils 10 bis 12 ml GIBCO RMPI (Zellkulturmedium, welches im Rosewell Park Memorial Institute entwickelt wurde) 1640 (1x) mit Glutamax - versetzt mit 10 % fetalem Kalbsserum (FCS) sowie 100 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin- kultiviert. Waren die Zellen zu etwa 80 % konfluent, wurden sie in jeweils zwei neue Zellkulturflaschen aufgesplittet. Sie wurden einmalig mit Phosphat- gepufferter Kochsalzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen und anschließend mit Trypsin + 0,05 *Ethylen-Diamine-Tetraacetic-Acid* (EDTA) -Lösung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Es wurden regelmäßig Wechsel des Mediums unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Um sicherzustellen, dass genügend Material auch von frühen Zellkulturpassagen vorhanden war, wurden regelmäßig Proben der Zellen eingefroren. Zunächst wurden die Zellen hierzu wie oben im Detail beschrieben trypsiniert und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in ein Gefriermedium aus 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) und 90% FCS in beschrifteten Cryoröhrchen pipettiert. Sie wurden anschließend zwei Stunden bei -20°C eingefroren und dann über Nacht in den -80°C-Gefrierschrank überführt. Am nächsten Tag wurden die Cryoröhrchen in flüssigen Stickstoff transferiert.

Zum Auftauen der Zelllinien aus dem Stickstofftank wurden die Cryoröhrchen im Wasserbad aufgetaut. Anschließend wurde die Zelllösung in 9 ml Medium überführt und die Zellen für zehn Minuten bei 1500 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 3 ml Medium resuspendiert und anschließend in je eine mit 10 ml Medium vorbereitete 75 cm²-Zellkulturflasche gegeben.

3.2.2 Behandeln der Zelllinien mit den *Compounds*

Die Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 wurden in 25 cm²-Flaschen kultiviert, bis sie etwa 80 % konfluent waren. Anschließend wurden die 5 ml Kulturmedium durch je 5 ml Medium, mit dem darin verdünnten, jeweiligen *Compound* in den gewünschten

Konzentrationen oder der Lösungsmittel-Kontrolle DMSO in der gleichen Konzentration ersetzt.

Es erfolgte eine 24-stündige Inkubationszeit. Nach dieser wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin + 0,05 EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und nach Zugabe von 3 ml Medium in ein 10 ml Falcontube überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 800 rpm und Raumtemperatur 4 min abzentrifugiert. Aus den Zellpellets erfolgte die Proteinisolation.

3.2.3 Western Blot

Als erstes wurden für den Western Blot Proteine aus den Zellen isoliert: sämtliche Schritte wurden auf Eis durchgeführt, um ein Denaturieren der Proteine zu vermeiden. Die Zellpellets wurden dreimal mit 3 ml PBS gewaschen, bis keine Mediumrückstände mehr zu erkennen waren. Anschließend wurden die Pellets mit 150 μ l *radio immuniprecipitation assay* (RIPA) - Puffer in der Verdünnung 25:1 versetzt. Dieser wurde zuvor aus 5 ml RIPA-Lösung und 200 μ l *Complete* Proteinaseinhibitor-Lösung hergestellt. Die Zellpellets wurden im Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-*Tube* überführt. Nun erfolgte eine 15-minütige Inkubationszeit auf Eis, in der die Mischung alle 5 min mit dem Vortex-Gerät durchgemischt wurde. Dies diente der vollständigen Vermischung der Zellen mit dem Puffer, welcher die Proteine aus den Zellen löst. Anschließend erfolgte die Abzentrifugierung der Zellüberstände bei -4°C und 13.000 rpm über 30 min. Der Überstand, in dem die Proteine enthalten waren, wurde nun in neue, zuvor beschriftete Eppendorf-*Tubes* überführt. Es schloss sich die Konzentrationsmessung nach Bradford an.

Zur Konzentrationsmessung nach Bradford wurde das Extinktionsmessgerät von Biorad verwendet. Es wurde aus destilliertem Wasser (dH_2O) und BioRad Dye-Puffer in der Konzentration 5:1 eine Pufferlösung hergestellt. Zur Bestimmung des Leerwertes wurden 1998 μ l Pufferlösung sowie 2 μ l dH_2O in eine Küvette gegeben, mit einer Pipette vermischt und anschließend die Extinktion gemessen. Anschließend wurden statt den 2 μ l dH_2O jeweils 2 μ l der Probe hinzugegeben. Um Kontaminationen zu vermeiden erfolgte dies jeweils in einer neuen Küvette.

Für die Western-Blots wurde nach dem Prinzip des Wet-Blottings vorgegangen. Die Proteine wurden zunächst durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dies erfolgte in einer Blotting-Kammer der Firma BioRad mit Hilfe eines Ethanol-haltigen Transferpuffers. Es folgt die detaillierte Beschreibung des Vorgehens beim Western-Blot.

Benötigt wurden pro Gel ein Ansatz für das Sammelgel, in welchem sich die Proteine akkumulieren und ein Ansatz für das Trenngel, in welchem die eigentliche Trennung nach Länge stattfindet. Für das Sammelgel wurden 2,1 ml H₂O, 0,5 ml 30 % Acrylamid Mix, 0,38 ml 1M Tris mit pH 6,8, 0,04 ml 10 %-iges SDS sowie 0,04 ml Ammoniumpersulfat und 0,004 ml Tetramethylethyldiamin (TEMED) in ein 50 ml Falcon-*Tube* gegeben und für das Trenngel –hier exemplarisch für ein 15%-iges Trenngel, welches für Survivin benötigt wurde– 2,3 ml H₂O, 5ml 30 % Acrylamid Mix, 2,5 ml 1,5M Tris mit pH 8,8, 0,1 ml 10%-iges SDS sowie 0,1ml Ammoniumpersulfat und 0,004 ml TEMED. In einen Gelgießständer der Firma BioRad wurde zunächst das Trenngel gegossen. Es wurde gewartet, bis dieses eine gelartige Konsistenz annahm. Damit das Gel gerade wurde, wurde oberhalb des Gels in den Gelgießständer Ethanol gegossen. Dieses wurde anschließend abgeschüttet. Nun wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zum Ausbilden der Taschen zur Proteinbefüllung hineingegeben. Auch das Sammelgel wurde für 20 bis 30 min inkubiert, bis es eine gelartige Konsistenz erreichte. Die beschriebenen Vorgänge wurden aufgrund der Toxizität der Reagenzien unter dem Abzug durchgeführt. Es konnte nun das Befüllen der Gele erfolgen. Dazu wurden die Gele in die BioRad-Kammern gesteckt und diese mit einfach konzentriertem Laufpuffer (s.o.) gefüllt. Anschließend wurden die schon mit Laemmli-Puffer versetzten Proteine auf Eis aufgetaut und dann unter dem Abzug in die Gelkammern gefüllt. Nun erfolgte das Auftrennen der Proteine durch die Elektrophorese.

Die BioRad-Kammer wurde komplett mit Laufpuffer befüllt und im Kühlschrank zunächst 30 min bei 90 Volt und anschließend 90 min bei 115 Volt angeschlossen. Die ersten 30 min dienten dazu, die Proteine im Sammelgel alle auf eine Höhe zu bringen. Anschließend wurden die Proteine durch die Elektrophorese der Länge nach sortiert.

Es folgte das Blotting der Proteine vom Gel auf die Nitrocellulosemembran in einer Blotting-Kammer der Firma BioRad.

Anschließend erfolgte die Färbung der Membran mit Ponceau-S-Lösung, um sicherzustellen, dass die Proteine transferiert wurden. Die Position der Banden wurde mit Bleistift gekennzeichnet, da anschließend die Membran wieder mit *Tris buffered saline with tween* (TBS-T) entfärbt wurde.

Zur Blockierung wurden die Membranen zunächst je nach Primärantikörper (siehe Tabellen 7 und 8) in der entsprechenden Milchlösung eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rollbrett inkubiert. Mit dem Primärantikörper wurden die Membranen über Nacht in 5 %-iger Milchlösung bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen zweimal 5 min mit TBS-T gewaschen. Darauf folgte das Auftragen der Sekundärantikörper nach Tabelle 9. Diese wurden zuvor alle jeweils mit 1,3 µl Precision Strep Tactin-HRP pro 3 ml Milch/*bovine serum albumin* (BSA) der Firma BioRad versetzt, um die Antikörperreaktion zu verstärken. Es folgte die Inkubation auf dem Rollbrett bei Raumtemperatur für eine Stunde. Im Folgenden wurden die Membranen einmal fünf und einmal zehn Minuten mit TBS-T gewaschen.

Anschließend erfolgte das Versetzen der Membran mit einer eins zu eins Mischung aus der Luminol/Enhancer Solution (BioRad) und der Peroxide Solution (BioRad). Die Inkubation erfolgte im Dunkeln etwa 2 bis 5 min bis zum Aufleuchten der Banden. Daraufhin wurden im VersaDoc Photographien der Membranen gemacht.

Die Membranen wurden anschließend erneut zweimal 5 min mit TBS-T gewaschen und es erfolgte die Detektion der Ladungskontrolle analog zur zuvor beschriebenen Vorgehensweise. Schließlich konnten die Membranen für einige Tage in TBS-T bei 4°C gelagert oder bei -20°C eingefroren werden.

Es folgt die tabellarische Auflistung der im Western Blot verwendeten Antikörper.

Tabelle 7: Primärantikörper Western Blot

Antikörper	Firma	Verdünnung	Inkubation
Human cIAP1/HiAP-2 Antibody	R&D Systems	1/400	Über Nacht in 5 %-iger Milchlösung bei 4 °C
Affinity-Purified Goat Anti-human cIAP2 (HIAP1)	R&D Systems	1/2000	Über Nacht in 5 %-iger Milchlösung bei 4 °C
Purified Mouse Anti-XIAP	BD Transduction Laboratories	1/1000	Über Nacht in 2,5 %-iger Milchlösung bei 4°C
Survivin Antibody	Novus Biologicals	1/1000	Über Nacht in 5 %-iger Milchlösung bei 4°C
PARP	Cell Signaling	1/1000	Über Nacht in 5 %-iger Milchlösung bei 4°C
Caspase-3	Cell Signaling	1/500	Über Nacht in 5 %-iger Milchlösung bei 4°C
Monoclonal Anti-alpha-Tubulin	Sigma Aldrich	1/5000	40 min in 5 %-iger Milchlösung bei RT
Mouse Monoclonal to GAPDH	abcam	1/1000	40 min in 5 %-iger Milchlösung bei RT

Tabelle 8: Sekundärantikörper Western Blot

Antikörper	Firma	Verdünnung	Inkubation
Anti-rabbit HRP-linked Antibody	IgG, Cell Signalling	1/1000	1 h in 5 %-iger Milchlösung bei RT
Anti-mouse IgG	Sigma Aldrich	1/5000	40 min in 5 %-iger Milchlösung bei RT
Anti-Goat Antibody	Cell Signaling	1/1000	1 h in 5 %-iger Milchlösung bei RT

3.2.4 MTS-Assay

MTS steht für 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, ein Reagenz, welches von lebenden Zellen zu einem farbigen Formazan-Produkt umgesetzt wird. Die Extinktion kann anschliessend gemessen werden.

Zunächst wurden die Zelllinien in 96 well-Platten ausgesät. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sie zu 50 bis 70% konfluent waren. Anschließend wurden die Zellen 24 Stunden im Brutschrank inkubiert, um die Adhäsion am Boden der wells zu gewährleisten.

Darauf folgte ein Versetzen der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen *Compounds* sowie der Lösungsmittel-Kontrolle DMSO in den gleichen Konzentrationen. Zunächst wurden dazu die verschiedenen *Compounds* im zellkulturmedium verdünnt. Anschließend erfolgte das Abnehmen des Mediums aus jeweils einer Reihe der Platte mit dem Vakuum-Saugsystem der Bench. Nun wurden je drei wells mit 100 µl einer Verdünnung befüllt.

Die Platten wurden 48 und 96 Stunden inkubiert, worauf die Ermittlung der Zellviabilität mittels MTS-Assay und Extinktionsmessung folgte.

Mit einer Multipipette wurden je 20 µl CellTiter 96 Aqueous one Solution Cell Proliferation Assay der Firma Promega auf die Zellen gegeben. Der Leerwert setzte sich zusammen aus 100 µl Medium und 20 µl CellTiter 96 Aqueous one Solution Cell Proliferation Assay. Darauf folgte die Messung im Infinite 200-Extinktionsmessgerät mit Hilfe des Programms tecan-i-control. Die Extinktion wurde nach 30, 60 und 90 min bestimmt. Jedes Assay wurde mindestens dreimal durchgeführt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen Excel und GraphPadPrism.

3.2.5 BrdU -Assay

BrdU steht für Bromodeoxyuridin, ein Analogon des Nukleosids Thymidin, welches statt Thymidin in die DNA von proliferierenden Zellen eingebaut wird.

Auch für den BrdU-Assay wurden die Zelllinien in 96 well-Platten ausgesät. Zunächst wurden die Zellen 24 Stunden im Brutschrank inkubiert, um die Adhäsion am Boden der Platte zu gewährleisten.

Dann erfolgte das Versetzen der Zellen mit den *Compounds* analog zum MTS-Assay. Nach 48 und 96 Stunden erfolgte die Messung der Zellproliferation mittels BrdU - Assay. Hierzu mussten die Zellen 24 Stunden vor der Messung mit der BrdU-Labeling-Solution versetzt werden. Dies diente dazu, dass die Zellen Bromdesoxyuridin anstelle von Thymidin in die DNA einbauten, damit dieses anschließend gemessen werden konnte. Die BrdU-Labeling-Solution wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Nach 24 Stunden wurde das Medium von den 96well-Platten abgeschüttet. Anschließend wurden die Zellen analog zum Protokoll der Firma Roche mit je 200 µl FixDenat für 30 min fixiert. Diese wurde erneut abgeschüttet. Dann erfolgte eine 90-minütige Inkubation mit je 100 µl Anti-Pod-Working solution, die zuvor nach Protokoll angesetzt worden war. Anschließend wurden die Platten mit jeweils 200 µl D-PBS gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von 100 µl Substrate solution pro well. Sobald eine bläuliche Verfärbung erschien, wurde die Extinktion mittels des Infinite Reader 200 bei 370nm und 492nm als Referenzwellenlänge gemessen. Zusätzlich erfolgte die Messung eines Leerwertes mit 100 µl Medium, 10 µl BrdU-Labeling-Solution sowie 100 µl Anti-Pod-Working solution ohne Zellen. Die Auswertung der Daten erfolgte analog zum MTS-Assay mittels Excel und GraphPadPrism.

Die Ergebnisse wurden jeweils in mindestens drei unabhängigen Experimenten bestätigt.

3.2.6 Caspase-Assay

Für den Caspase-Assay zur Bestimmung der Caspaseaktivität in mit YM155 oder M4N behandelten Zellen wurden die Zellen erneut in 96-well-Platten ausgesät, sodass sie etwa 70% konfluent waren. Es wurden speziell für Lumineszenzassays verwendbare, weiße Platten der Firma Greiner verwendet. Um ein Anwachsen der Zellen zu gewährleisten, wurden die Platten 12-24 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zunächst Medium mit den gewünschten Konzentrationen von YM155 und M4N bzw. DMSO hergestellt. Nun erfolgten das Absaugen des Mediums

und das Versetzen der Zellen mit den *Compounds*. Die Caspase-Aktivität ließ sich bei beiden Zelllinien für YM155 bereits nach sechs Stunden nachweisen, sodass diese als Inkubationszeit festgelegt wurde. Verwendet wurde der Caspase-Glo 3/7-Assay von Promega. Entsprechend des Protokolls wurde zunächst der Caspase-Glo 3/7 Buffer mit dem Caspase-Glo 3/7-Substrate gemischt. Anschließend wurde die Mischung nach der Inkubationszeit im Verhältnis eins zu eins zur im well enthaltenen Flüssigkeit auf die Zellen gegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lumineszenz mit einer Integrationszeit von 1000 ms mit Hilfe des Infinite readers 200 gemessen. Es wurde jeweils ein Leerwert mit Medium und Caspasereagenz bestimmt. Um sicherzugehen, dass tatsächlich die Caspase-Aktivität bestimmt wurde, wurde ein Assay mit dem Caspase-Inhibitor Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon (kurz Z-VAD-FMK) durchgeführt. Z-VAD-FMK ist ein synthetisches Protein, welches irreversibel die Aktivität der Caspasen hemmt und Apoptose hemmt (Herstellerinformation PromoKine, 2014). Hierzu wurden die Zellen jeweils einmal nur mit YM155 bzw. DMSO und einmal mit YM155 bzw. DMSO und Z-VAD-FMK versetzt. Anschließend wurde vorgegangen wie zuvor beschrieben.

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe von Excel und GraphPadPrism ausgewertet. Es erfolgten jeweils drei unabhängige Versuche.

3.2.7 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte, um die subzelluläre Lokalisation von Survivin und XIAP in NEC-Zelllinien anschaulich nachzuweisen. Zunächst wird ein Antikörper hinzugegeben, der an das gewünschte Protein bindet. Anschließend wird an diesen ersten Antikörper ein fluoreszierender Antikörper gebunden, der dann unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird und die Expression der Proteine in den einzelnen Zellkompartimenten zeigt. Es wurde stets eine Isotyp-Kontrolle zur Negativkontrolle mitgeführt.

Es erfolgte zudem eine Kernfärbung mittels Hoechst-Färbung (Latt, Stetten et al. 1975), um die Expressionsmuster in den Zellen besser beurteilen zu können.

Dazu wurden zunächst Zellen beider Zelllinien auf Chamber Slides ausgesät. Bei 70% Konfluenz wurden die Zellen auf den Objektträgern fixiert, um sie anschließend färben zu können.

Zunächst wurde das Medium aus den Chamber Slides entfernt. Es erfolgte das Waschen der Objektträger mit PBS für zweimal fünf Minuten. Daraufhin wurden die Objektträger für fünf Minuten in eiskaltem Methanol und anschließend für drei Minuten in eiskaltem Aceton inkubiert. Nun konnten die Objektträger bis zur Färbung bei -20°C aufbewahrt werden.

Für den immuncytochemischen Nachweis von XIAP wurden die Zellen zunächst mit Triton permeabilisiert und daraufhin dreimal mit PBS gewaschen. Nun erfolgte das Blockieren von unspezifischen Antikörperbindungen mit 20% Serum der Blutgruppe AB in DPBS, welches vorher auf einen pH-Wert von 7,4 gebracht wurde. Nun konnte die Inkubation über 45 min mit dem XIAP-Antikörper erfolgen. Genauere Angaben zu den Antikörpern und Verdünnungen finden sich in Tabelle 9. Anschließend erfolgte wieder ein dreimaliges Waschen in PBS. Das weitere Vorgehen erfolgte im Dunkeln, um die Fluoreszenz zu gewährleisten. Nun wurden die Objektträger mit dem Alexa-Fluor 555 (goat- α -mouse)-Antikörper für 30 min inkubiert. Es erfolgte das Waschen mit PBS und die anschließende Kernfärbung mit 4', 6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) 0,125 μ l/ml über 10 min. Anschließend erfolgte wiederum eine Waschung mit PBS.

Zur Detektion von Survivin wurden die Objektträger zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Es erfolgte die Blockierung mit 1:20 verdünntem Goat-Serum zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen des Antikörpers. Daraufhin wurden die Zellen über 45 min mit dem Survivin-Antikörper inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Nun erfolgte ebenfalls das weitere Vorgehen im Dunkeln. Es erfolgte die Inkubation mit Alexa-Fluor 555 rabbit-mouse über 30 min. Anschließend erfolgten das dreimalige Waschen der Objektträger mit PBS sowie die Färbung mit DAPI wie oben beschrieben.

Nach der Eindeckelung der Objektträger mittels Vectashield konnten diese unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden.

Tabelle9: Antikörper Immunfluoreszenz

Antikörper	Details	Verdünnung	Inkubation
SVV	NB	1:100 in 10 % AB/DPBS	45 min
Isotyp SVV	X0903	1:25 in 10 % AB/DPBS	45 min
Alexa Fluor 555	rabbit-mouse	1:200 in 10 % AB/DPBS	30 min
XIAP	Clone 28 BDs	250 µl/ml in 10 % AB/DPBS	45 min
Isotyp XIAP	MOPC 21	1 mg/ml in 10 % AB/DPBS	45 min
Alexa Fluor 555	goat- α -mouse	1:200 in 10 % AB/DPBS	30 min

3.2.8 Quantitative Real Time PCR

Mittels der quantitativen *Real Time* Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) lässt sich die Ribonukleinsäure (*ribonuclein acid*, RNA)-Expression in Zellen nachweisen. Die Methode wurde in den 80er Jahren von Mullis und Faloona entwickelt (Mullis and Faloona 1987). Es erfolgte zunächst die RNA-Isolation aus den Zellen. Anschließend wurde aus der RNA cDNA (*copyDNA*) hergestellt, welche wiederum für die PCR verwendet wurde. Diese wird zur Amplifikation der cDNA verwendet und erfolgt in mehreren Zyklen. Ein Zyklus beinhaltet die DNA-Denaturierung bei 93-95°C, die Anlagerung der Primer bei 50-65°C sowie die Neusynthese der DNA durch die Taq-Polymerase bei 72°C. Diese Polymerase stammt aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Es werden Fluoreszenz-Farbstoffe hinzugegeben, die in die DNA interkalieren, deren Fluoreszenz dann mit einer Kamera gemessen werden kann. Somit kann die Quantifizierung in Echtzeit („*Real Time*“) erfolgen. Wir verwendeten hier SYBR-Green entsprechend dem Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG Kit.

Die Zyklen können im ThermoCycler der Firma BioRad beliebig oft durchgeführt werden bis genügend Material für eine Gelelektrophorese oder anderweitige Analyse der cDNA vorhanden ist.

3.2.8.1 RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA aus behandelten sowie unbehandelten Zellen erfolgte zunächst wie oben beschrieben das Abtrypsinieren der Zellen. Im Folgenden wird nicht einzeln auf die Vorbehandlung der Zelllinien eingegangen, sondern nur das Vorgehen der RNA-Isolierung nach in unserem Labor etabliertem Standard-Protokoll beschrieben.

Das gesamte Vorgehen erfolgte auf Eis, um eventuelle Schäden an der RNA möglichst gering zu halten. Zunächst wurden die Zellpellets in 2 ml PBS resuspendiert und anschließend bei 800 rpm abzentrifugiert. Pro Zellpellet wurden nun 350 µl RLT-Puffer (RNeasy-Kit von Qiagen) mit β-Mercaptoethanol hinzugegeben und resuspendiert. Der RLT-Puffer wurde zuvor mit 10 µl β-Mercaptoethanol pro 1 ml RLT-Puffer vorbereitet. Die nun entstandene Mischung wurde mit Hilfe von Spritzenkanülen (1 ml, Braun) resuspendiert und anschließend in zuvor vorbereitete Eppendorf-*Tubes* überführt.

Die Messung der Konzentration der gewonnenen RNA erfolgte mit dem Spektralphotometer TECAN Infinite Reader200 durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm Wellenlänge. Zunächst wurde mit 2 µl dH₂O ein Leerwert gemessen und anschließend wurden je 2 µl der Probe aufgetragen.

3.2.8.2 Reverse Transkription

Aus der nun hergestellten RNA wurde die cDNA für die Polymerase-Kettenreaktion hergestellt. Hierzu wurden zur RNA-Lösung zunächst pro Probe 2 µl Oligo dT-Primer hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation über 10 min bei 65°C im zuvor vorgeheizten Heizblock. Währenddessen wurde ein Master-Mix aus RT-Puffer, Protector RNase Inhibitor, Reverse Transkriptase sowie Oligonukleotiden hergestellt. Von diesem wurden je 7 µl zur RNA-Lösung hinzugegeben. Danach wurde die Lösung zunächst für 30 min bei 55°C und anschließend zur Inhibierung der Reversen Transkriptase 5 min bei 85°C inkubiert. Es wurde mittels des Spektralphotometer TECAN Infinite Reader200 die cDNA-Konzentration bestimmt. Nun konnte die cDNA-Lösung bei -20°C eingefroren werden oder weiter für die Real Time PCR verwendet werden.

3.2.8.3 Durchführung der RT-PCR

Auf einer 96well-Platte (Cellstar) wurde für die PCR jeweils ein doppelter Ansatz pipettiert. Pro Slot wurden der Master-Mix, die zuvor ausgewählte Sonde (Roche) sowie die zur kodierenden RNA-Sequenz zugehörigen Primer und anschließend entweder die cDNA-Probe, eine Referenz-cDNA oder dH₂O zur Kontrolle hinzugegeben. Der MasterMix beinhaltete 10 µl Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG, 1 µl BSA (Bovines Serumalbumin) und 6 µl dH₂O. Die cDNA wurde zuvor mit dH₂O auf eine Konzentration von 1 ng/µl verdünnt. Das gesamte Vorgehen erfolgte auf Eis zur Vermeidung von Schäden der cDNA.

Tabelle 10: Primer und Sonden RealTime PCR

Protein	Primer-Sequenz	Roche-Sonde
Survivin	CTGATTTGGCCCAGTGTTTT- ACGGTCAGTTCTTCCACCTG	11
XIAP	GAAGACCCTTGGGAACAACA- GTCCTTGAAACTGAACCCCA	68
cIAP1	GATATTGTGTCAGCACTTCTTAATGC- TCTGTTCTTCCGAATTAATGACAA	35
cIAP2	TGGCTACTTCAGTGGCTCCT- GCAAAGCAGGCCACTCTATC	80
GAPDH	AGCCACATCGCTCAGACAC- GCCCAATACGACCAAATCC	60

Die Annealingtemperatur der Primer betrug 60°C und es wurden je 40 Zyklen der zuvor beschriebenen Reaktion durchgeführt.

3.8.3.4 Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese der PCR-Produkte konnten die bei der PCR erhaltenen Produkte verifiziert werden: Zunächst wurde ein 2 %-iges Agarose-Gel hergestellt. Dazu wurden je nach benötigter Menge beispielsweise 2 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer unter Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Daraufhin wurde 1 µl GelRed pro ml

Gel hinzugefügt. Das Gel wurde dann jeweils für 45 min zur Polymerisation inkubiert und anschließend verwendet. Es wurden jeweils ein *Loading buffer* und dH₂O, die Referenz-cDNA sowie eine Probe auf das Gel aufgetragen.

3.8.3.5 Auswertung der RT-PCR mittels 2- $\Delta\Delta$ CT-Methode

Die PCR wurde mittels der *Comparative C_T* -Methode oder auch 2- $\Delta\Delta$ CT-Methode nach Schmittgen und Livak ausgewertet (Livak and Schmittgen 2001). Hierbei findet eine relative Messung der RNA-Amplifikation in Vergleich zu einem Kontrollwert statt (Livak and Schmittgen 2001). Der Kontrollwert wird mittels eines ubiquitinär exprimierten Proteins, in unserem Fall GAPDH, festgelegt. Diese ubiquitinär exprimierten Proteine nennt man auch *housekeeping* Gene oder Haushaltsgene.

C_T steht für *threshold cycle*. Der C_T Wert beschreibt die Größe, bei der die gemessene Fluoreszenz bei der PCR erstmals exponentiell über die sogenannte Hintergrund-Fluoreszenz oder den Hintergrundwert ansteigt. Bei niedrigem C_T-Wert sind somit zu Beginn der PCR viele Kopien des Amplifikats enthalten.

Es wurde die Differenz zwischen dem C_T -Wert für die GAPDH-Expression und der Expression des untersuchten Proteins gemessen, dies ergibt den Δ CT -Wert. Um die relative Veränderung („*fold change*“) der Expression des Zielgens im Vergleich zum ubiquitär exprimierten Gen in der Kontrolle zu messen, errechnet man 2- $\Delta\Delta$ CT. $\Delta\Delta$ CT ergibt sich aus der Subtraktion des Δ CT-Werts der Tumorzellprobe und dem Δ CT-Wert der Kontrolle.

Somit wurden folgende Formeln zur Berechnung verwendet:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT Survivin/XIAP} - \text{CT GAPDH}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT Tumorprobe} - \Delta\text{CT Kontrollprobe}$$

$$\text{relative Veränderungen der Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

3.2.9 Erfassung der Patientendaten für den Tissue Micro Array

Die Erfassung der Patientendaten erfolgte anhand der Pathologiebefunde sowie der Arztbriefe von Patienten, die in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und

Kinderchirurgie aufgrund eines GEP-NEN behandelt wurden. Es wurden Daten von 114 Patienten verwendet, die im Zeitraum vom Februar 1998 bis Januar 2013 eine chirurgische Resektion eines GEP-NEN erhalten hatten. Für die Verwendung der Daten liegt ein positives Ethikvotum mit der IRB (institutional review board) -Nummer 3821 der medizinischen Fakultät der Heinrich- Heine-Universität Düsseldorf vor. Die Klassifikation der Proben erfolgte nach den international anerkannten Leitlinien der UICC (*Union internationale contre le cancer*) sowie der aktuellen WHO-Klassifikation (Bosman 2010). Zusätzlich erfolgte aufgrund des Alters der Proben ein erneutes *Grading* der Tumoren entsprechend der WHO-Klassifikation von 2010 durch Frau Dr. med. Riemer (Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf) anhand des Ki67-Indexes.

3.2.10 Tissue Micro Array

Die *Tissue Micro Array* (TMA)-Technik ermöglicht das gleichzeitige Färben von bis zu 1000 Patientenproben. Dazu werden aus in Paraffin eingebetteten Proben genau die Areale herausgestanzt, in denen sich Tumorgewebe befindet und in einen neuen, zuvor leeren Paraffinblock überführt. Von diesem können anschließend Schnitte gefertigt und immunhistochemisch gefärbt werden. Hierzu wurde der *Manual Tissue Arrayer* MTA-1 von Beecher Instruments verwendet.

Zunächst wurden nach Lektüre der Pathologiebefunde die betreffenden Paraffinblöcke und Haematoxylin-Eosin (HE) gefärbte Schnitte der Patienten herausgesucht. Anschließend wurden, soweit keine Schnitte vorhanden waren, HE-Schnitte angefertigt.

So konnte mikroskopisch Tumorgewebe auf den jeweiligen Blöcken gesichert und markiert werden. Zur Kontrolle sowie zur Orientierung wurden auf jedem neu erstellten Block rechts seitlich untereinander je eine Probe einer Tonsille, von Skelettmuskulatur sowie Kolonkarzinom mitgeführt. Kolonkarzinom hatte sich in mehreren Kontrollen in unserem Labor als stark Survivin und XIAP-exprimierend erwiesen und diente somit als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle für XIAP wurde die Tonsille verwendet. Die Patientenproben wurden freundlicherweise aus dem Institut für Pathologie der Universitätsklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

Der Abstand zwischen den Stanzen einer Reihe sowie zwischen den Reihen betrug 1,5 mm. Von jedem Tumorareal wurden zwei Stanzen genommen, um dem Einfluss der Heterogenität innerhalb des Tumorgewebes auf die Färbung vorzubeugen.

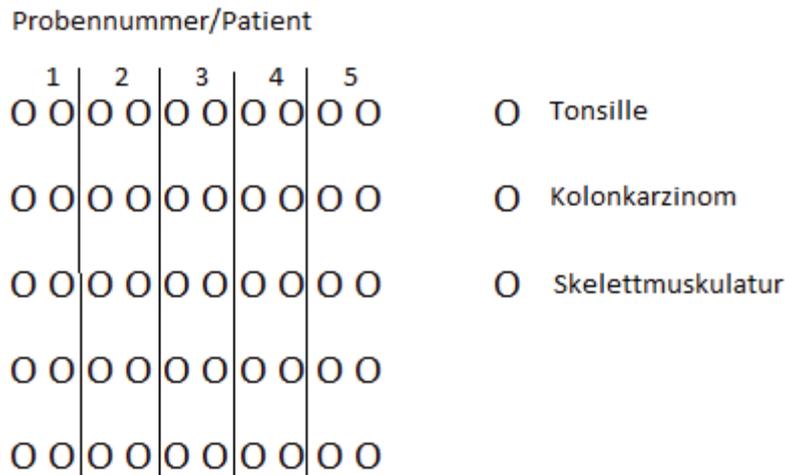


Abb. 4: Schematischer Aufbau TMA-Block

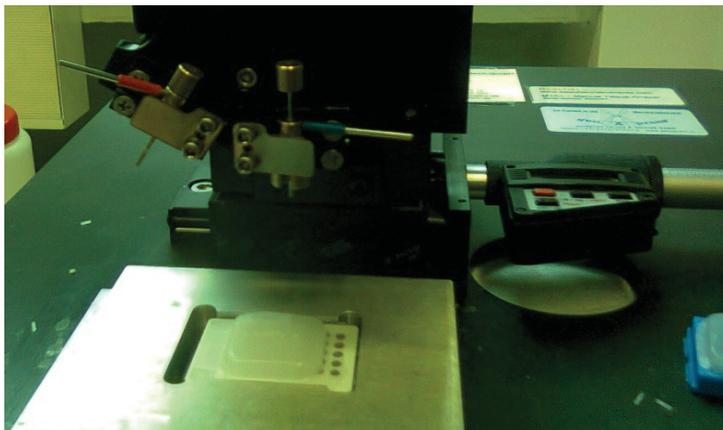


Abb. 5: Foto des *Manual Tissue Arrayer* MTA-1 (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA)

Verwendet wurde ein manuelles Stanzgerät. Zunächst wurde in den Empfänger-Paraffinblock mit der rot markierten Stanze ein 4 mm tiefes Loch mit 1,5 mm Durchmesser gestanzt. Anschließend wurde aus dem zuvor gekennzeichneten Areal mit der blau markierten Stanze eine Tumorprobe entnommen und in den Empfängerblock überführt. Anschließend wurde mit Hilfe der elektronischen Messhilfe (rechts im Bild) der Abstand zum nächsten Loch auf 1,5 mm eingestellt und der Vorgang für die gleiche Gewebeprobe wiederholt. Parallel wurden die Patientendaten in eine vorbereitete Tabelle eingetragen.

Zunächst wurden, soweit vorhanden, je zwei Stenzen des Primarius („T“), darauffolgend der Lymphknotenmetastasen („LK“) und auf diese folgend der Fernmetastasen (z.B. „M hep“ für Lebermetastase) eines Patienten gestanzt. Liegen Fernmetastasen von späteren oder früheren Entnahmezeitpunkten vor, wurde immer nach Eingangsdatum des Primarius sortiert.

In den ersten drei Reihen wurde jeweils nach der zehnten Stanze 3 mm Platz gelassen, worauf in Reihe eins eine Stanze der Tonsille, in Reihe zwei eine Stanze des Kolonkarzinoms und in Reihe drei eine Stanze der Skelettmuskulatur folgte (siehe Abb. 4).

Um die Verbindung der Stenzen mit dem Paraffin des Empfängerblockes zu gewährleisten wurden alle TMA-Blöcke für 30 min auf 60°C erhitzt.

Mit dem Mikrotom wurden Schnitte der TMA-Blöcke hergestellt, worauf eine kurzfristige Lagerung bei Raumtemperatur erfolgte.

3.2.11 Immunhistochemie und mikroskopische Auswertung

Es erfolgte die Entparaffinierung der Schnitte, zunächst mit Xylol und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe und darauffolgend eine fünfminütige Inkubation in dH₂O. Nun erfolgte die Demaskierung. Die Schnitte wurden in Retrieval Solution für 30 Minuten in der Mikrowelle erhitzt. In dieser Zeit wurde eine PBS und 0.1 % Tween 20 Lösung hergestellt. Nach Abkühlen der Schnitte wurden diese für fünf Minuten mit der PBS-T Lösung gewaschen. Nach Abtrocknen erfolgte die Umrandung der Schnitte auf dem Objektträger mittels Pap Pen Mini. Nun wurde die endogene Peroxidase für 10 Minuten mit 150 µl 3%-iger Wasserstoffperoxid-Lösung inhibiert. Der nächste Schritt war wieder ein Waschen der Schnitte mit PBS-T für dreimal fünf Minuten. Hierauf folgte die Inkubation mit der Blockierlösung aus dem ZytoChem-Plus HRP-Kit für 10 Minuten, im Anschluss wurden die Schnitte einmal in PBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit den jeweiligen Antikörpern sowie den entsprechenden Negativkontrollen inkubiert. Diese wurden folgenderweise mit Antibody diluent verdünnt:

Tabelle 11: Antikörper Immunhistochemie

Antikörper	Firma	Verdünnung
Survivin Antibody	Novus Biologicals	1:1000
Purified Mouse Anti-XIAP	BD Transduction Laboratories	1:1000

Die Schnitte wurden für eine Stunde mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Zunächst wurden die Proben nun wieder dreimal gewaschen. Hierauf schloss sich die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 15 Minuten an. Anschließend wurden die Schnitte wieder gewaschen. Nun wurde das Enzymkonjugat aufgetragen und die Schnitte wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Waschung in dH₂O für fünf Minuten. Dann erfolgte bei geschlossenem Deckel der Färbekammer eine Inkubation in DAB für fünf Minuten. Daraufhin wurden die Schnitte zwei bis drei Minuten in dH₂O gewaschen und anschließend für etwa 15 Sekunden mit Mayers Hämalaun benetzt. Es schloss sich ein Waschen mit H₂O sowie die Inkubation für je eine Minute in der aufsteigenden Alkoholreihe an. Die Ausnahme bildete hier das Xylol, in diesem wurde für zwei Minuten inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte mit Deckgläschen und Corbit-Balsam unter dem Abzug eingedeckelt und über Nacht dort belassen. Anschließend erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur.

Nach der immunhistochemischen Färbung der Schnitte erfolgte die mikroskopische Auswertung. Sie erfolgte nach einer leicht modifizierten Art des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner (Remmele and Stegner 1987). Es wurden die Farbintensität sowie der Prozentsatz an positivem Zytoplasma bzw. positiver Zellkerne herangezogen. Für Survivin wurde die Kernfärbung sowie die Färbung des Zytoplasmas beurteilt, während die Färbung für XIAP keine Kernfärbung darstellt und somit nur das Zytoplasma bewertet wurde.

Die Proben wurden von zwei unabhängigen Untersuchern (K. A. Oesterwind, PD Dr. med. L. Dizdar) zweizeitig bewertet. Zusätzlich wurde für jede Probe erneut ein histologisches *Grading* nach dem Ki67-Index durch eine erfahrene Pathologin (Dr. med. J. Riemer) durchgeführt.

Tabelle 12: Auswertung der immunhistochemischen Färbung anhand folgender Tabelle (modifiziert nach Remmele und Stegner) (Remmele and Stegner 1987)

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

3.2.12 Statistische Auswertung des Tissue Micro Array

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS Statistik für Windows (Version 17.0, Chicago, SPSS Inc.).

In der Analyse des Tissue Micro Array erfolgte die Korrelation der Survivin- bzw. XIAP-Expression mit klinisch pathologischen Parametern. Diese wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test (Whitney 1947) analysiert. Die Expressionsunterschiede zwischen dem Tumorgewebe und dem Normalgewebe wurden ebenfalls mit dem Mann-Whitney-U-Test statistisch ermittelt.

Um die Expression von Survivin und XIAP mit klinisch pathologischen Variablen zu vergleichen, wurden die Tumore entsprechend des IRS in Tumore mit hoher ($IRS > 2$) und niedriger ($IRS \leq 2$) Survivin- bzw. XIAP-Expression kategorisiert. Hier wurde der Median des IRS-Wertes für Survivin und XIAP-Expression in den untersuchten Proben verwendet. Die kategorialen Daten wurden anhand des Chi-Square-Tests analysiert.

Zur Analyse der Überlebensdauer wurden Kaplan-Meier-Kurven erstellt. Die Überlebensrate oder *Overall survival* wurde definiert als die Zeit vom ersten Eingriff

bis zum Tode (unabhängig von der Ursache) oder dem letzten dokumentierten Follow-Up. Die Analyse erfolgte mittels des Log-Rank-Test oder Test nach Cox und Mantel (Mantel 1966). Für die multivariate Analyse wurden alle Variablen mit einem p-Wert unter 0.1 in die Regressionsanalyse nach Cox mit einbezogen. (Dizdar, Oesterwind et al. 2017). Die Darstellung der Regressionsanalyse erfolgt in Kaplan-Meier Kurven und wird als Hazard Ratio mit 95% Konfidenzintervall dargestellt (Abb. 7-9).

Das Signifikanzniveau wurde ab einem p-Wert von unter <0.05 als signifikant festgelegt (Dizdar, Oesterwind et al. 2017).

Von der statistischen Analyse ausgenommen wurden Patienten, die innerhalb von 30 Tagen verstarben oder bei denen eine inkomplette Tumorresektion durchgeführt wurde. Patienten, für die nur Metastasengewebe und keine Proben des Primärtumors vorlagen, wurden ebenfalls von der Analyse ausgeschlossen. So verblieben insgesamt die Daten von 77 Patienten zur Korrelation mit klinischen Daten.

Tabelle 13: Patientenkollektiv wie für die Auswertung der Daten verwendet: n= 77 nach Aussortieren der Patientenproben, bei denen keine Proben des Primärtumors (nur Metastasengewebe) vorlag. Aufgeschlüsselt nach Alter, Geschlecht, Tumorstadium

Variable	Anzahl Patienten(%)
<i>Alter</i>	
≤ 65	35 (45.5)
> 65	41 (53.2)
Unbekannt	1 (1.3)
<i>Geschlecht</i>	
männlich	38 (49.4)
weiblich	39 (50.6)
<i>Tumorstadium</i>	
T1	13 (16.9)
T2	19 (24.7)
T3	29 (37.7)
T4	10 (13)
Unbekannt	6 (7.8)
<i>Lymphknotenmet.</i>	
Negativ	33 (42.9)
Positiv	39 (50.6)
Unbekannt	5 (6.5)
<i>Fernmetastasen</i>	
Negative	50 (64.9)
Positive	27 (35.1)
<i>Grading</i>	
G1	46 (59.7)
G2	11 (14.3)
G3	20 (26)
<i>Resektionsränder</i>	
Negativ	65 (84.4)
Positiv	12 (15.6)
<i>Lokalisation</i>	
Pankreas	35 (45.5)
Magen	9 (11.7)
Dünndarm	15 (19.5)
Kolon	18 (23.4)

3.2.13 Statistische Auswertung der Zellkulturversuche

Die Zellkulturversuche wurden jeweils in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die Standardabweichung, der Mittelwert und die Verteilung wurden berechnet und mittels Mann-Whitney-Test (Whitney 1947) auf ihre Signifikanz überprüft. Eine Signifikanz wurde ab p-Werten von unter 0.05 angenommen. Die statistische Auswertung wurde mit den Programmen GraphPadPrism für Windows (Version 5, GraphPad Software, San Diego, California, USA) sowie SPSS Statistik für Windows (Version 17.0, SPSS Inc, Chicago, USA) durchgeführt (Dizdar, Oesterwind et al. 2017).

Die mittlere Hemmkonzentration oder IC_{50} wurde mittels logistischer Regressionsanalyse berechnet. Sie bezeichnet die Konzentration eines Hemmstoffes, bei der die halbmaximale Hemmung beobachtet wird.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von Survivin und XIAP in GEP-NEN: Tissue Micro Array

Zunächst konnte mittels Immunhistochemie die nukleäre und zytoplasmatische Expression von Survivin sowie die zytoplasmatische Expression von XIAP nachgewiesen werden (Abbildung 6).

Nach Auswertung der Proben erfolgte anschließend die Korrelation mit klinisch pathologischen Parametern. Für die Auswertung wurde der Immunreaktive Score nach Remmele und Stegner (Remmele and Stegner 1987), wie in Tabelle 14 dargestellt, verwendet. Für Survivin wurde die Kernfärbung sowie die Färbung des Zytoplasmas beurteilt, während die Färbung für XIAP keine Kernfärbung darstellt und somit nur das Zytoplasma bewertet wurde. Die Proben wurden von zwei unabhängigen Untersuchern (K. A. Oesterwind, PD Dr. med. L. Dizdar) zweizeitig bewertet. Zusätzlich wurde für jede Probe erneut ein histologisches *Grading* nach dem Ki67-Index durch eine erfahrene Pathologin (Dr. med. J. Riemer) durchgeführt.

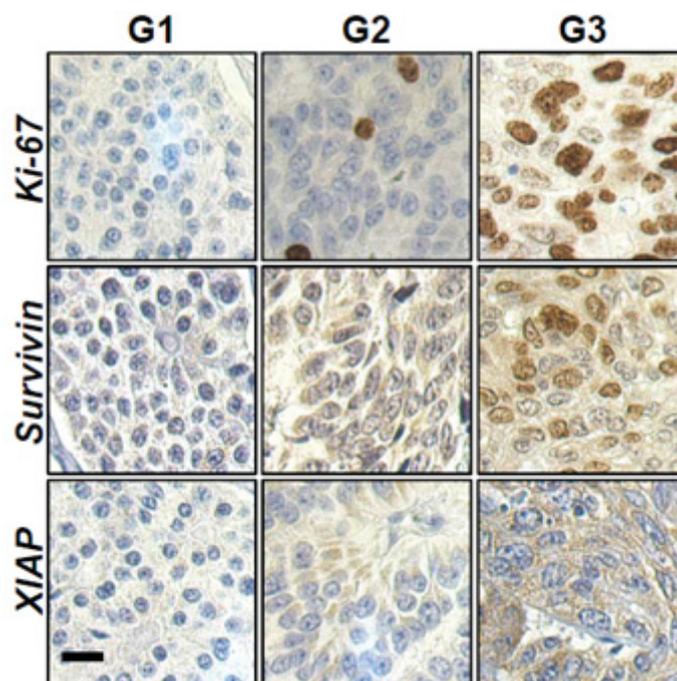


Abb. 6: Expression von XIAP, Survivin, Ki-67 (Grading) in einem niedrig malignen G1-Tumor (erste Spalte), einem mittelgradigem G2-Tumor (mittlere Spalte) sowie einem hochmalignen G3 Tumor (letzte Spalte. Aufgenommen mittels Leica Application Suite. Vergrößerung 400-fach, Massstab 10 μm (Dizdar, Oesterwind et al. 2017).

4.1.2 Korrelation klinisch pathologischer Daten mit der Expression von XIAP und Survivin in neuroendokrinen Tumoren

Die häufigste Tumorentität in der untersuchten Population waren neuroendokrine Tumore des Pankreas mit 45.5 %, die zweithäufigste des Kolons, Tumore im Magen waren mit 11.7 % am seltensten vertreten. Zu 84.4 % wurden die Tumore R0-reseziert und zu 59.7 % bestanden niedrig maligne G1-Tumore. Die aggressiven G3-Karzinome waren mit 26 % vertreten. Männer (49.4 %) und Frauen (50.6 %) waren etwa gleich häufig betroffen, ebenfalls zeigte sich in unserer Population kein relevanter Alterspeak (unter 65 Jahren: 45.5 % der Patienten, über 65 Jahren: 53.2 % der Patienten, vergleiche Tabelle 13).

Um die Expression von Survivin und XIAP mit klinisch pathologischen Variablen zu vergleichen, wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, die Tumore entsprechend des IRS in Tumore mit hoher ($IRS > 2$) und niedriger ($IRS \leq 2$) Survivin- bzw. XIAP-Expression kategorisiert.

Es zeigte sich eine signifikant (p -Wert < 0.001) höhere Expression von nukleären sowie zytoplasmatischen Survivin in der Gruppe der neuroendokrinen Karzinome im Vergleich zu den neuroendokrinen Tumoren. Zudem zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen hoher Survivin Expression und einer Tumorlokalisation im Kolon oder Magen (Tabellen 14 und 15).

Eine Korrelation zum Proliferationsindex war für XIAP nicht nachweisbar. Es zeigte sich bei erhöhter XIAP-Expression allerdings eine Korrelation zu einem fortgeschrittenen Tumorstadium (Tabelle 16).

In unserem Patientenkollektiv ließ sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von Survivin oder XIAP und Faktoren wie Geschlecht, Alter oder Metastasierungsstatus der Patienten nachweisen (Tabelle 14-16).

In der univariaten Überlebensanalyse war eine erhöhte nukleäre sowie zytoplasmatische Survivin-Expression (IRS-Score > 2) mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben der Patienten verbunden (Abbildungen 7-9, Tabelle 17). Darüber hinaus waren ein fortgeschrittenes Tumorstadium, das Vorhandensein von

Lymphknoten- oder Fernmetastasen sowie ein hohes *Grading* (G3) mit einer verminderten Überlebenszeit assoziiert. Für die XIAP-Expression ließ sich kein Zusammenhang mit der Überlebenszeit feststellen (Tabelle 19).

In der multivariaten Analyse stellten sich schlussendlich ein hohes *Grading* sowie eine Lymphknotenmetastasierung als unabhängige prognostische Faktoren heraus (Tabelle 18).

Tabelle 14: Korrelation der nukleären Survivin-Expression mit klinisch pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Tumorstadium nach TNM sowie Lokalisation

<i>Variable</i>	Survivin-Expression (nukleär)		p-Wert
	Gering (IRS ≤ 2)	Hoch (IRS > 2)	
<i>Geschlecht</i>			
Männlich	22	16	0.74
Weiblich	24	15	
<i>Tumorstadium</i>			
T1+T2	22	10	0.29
T3+T4	22	17	
<i>Lymphknotenmet.</i>			
Negativ	20	13	0.94
Positiv	24	15	
<i>Fernmetastasen</i>			
Negativ	27	23	0.16
Positiv	19	8	
<i>Grading</i>			
G1 + G2	43	14	<0.001
G3	3	17	
<i>Resektionsränder</i>			
R0	38	27	0.59
R1	8	4	
<i>Lokalisation</i>			
Pankreas	26	9	<0.001
Magen	3	6	
Dünndarm	13	2	
Kolon	4	14	

Tabelle 15: Korrelation der zytoplasmatischen Expression von Survivin mit klinisch pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Tumorstadium nach TNM sowie Lokalisation

<i>Variable</i>	Survivin-Expression (zytoplasmatisch)		p-Wert
	Gering (IRS ≤ 2)	Hoch (IRS > 2)	
<i>Geschlecht</i>			
Männlich	9	39	0.54
Weiblich	7	32	
<i>Tumorstadium</i>			
T1+T2	8	24	0.65
T3+T4	8	31	
<i>Lymphknotenmet.</i>			
Negativ	6	27	0.45
Positiv	10	29	
<i>Fernmetastasen</i>			
Negativ	8	42	0.16
Positiv	8	19	
<i>Grading</i>			
G1 + G2	15	42	0.04
G3	1	19	
<i>Resektionsränder</i>			
R0	12	53	0.24
R1	4	8	
<i>Lokalisation</i>			
Pankreas	7	28	0.01
Magen	2	7	
Dünndarm	7	8	
Kolon	0	18	

Tabelle 16: Korrelation der Expression von XIAP mit klinisch pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Tumorstadium nach TNM sowie Lokalisation, XIAP wird nur zytoplasmatisch exprimiert, daher keine Aufschlüsselung nach Expressionsort möglich

<i>Variable</i>	XIAP-Expression		p-Wert
	Gering (IRS ≤ 2)	Hoch (IRS > 2)	
<i>Geschlecht</i>			
Männlich	32	6	0.47
Weiblich	35	4	
<i>Tumorstadium</i>			
T1+T2	31	1	0.03
T3+T4	31	8	
<i>Lymphknotenmet.</i>			
Negativ	29	4	0.93
Positiv	34	5	
<i>Fernmetastasen</i>			
Negativ	42	8	0.28
Positiv	25	2	
<i>Grading</i>			
G1 + G2	52	5	0.06
G3	15	5	
<i>Resektionsränder</i>			
R0	56	9	0.60
R1	11	1	
<i>Lokalisation</i>			
Pankreas	31	4	0.23
Magen	7	2	
Dünndarm	15	0	
Kolon	14	4	

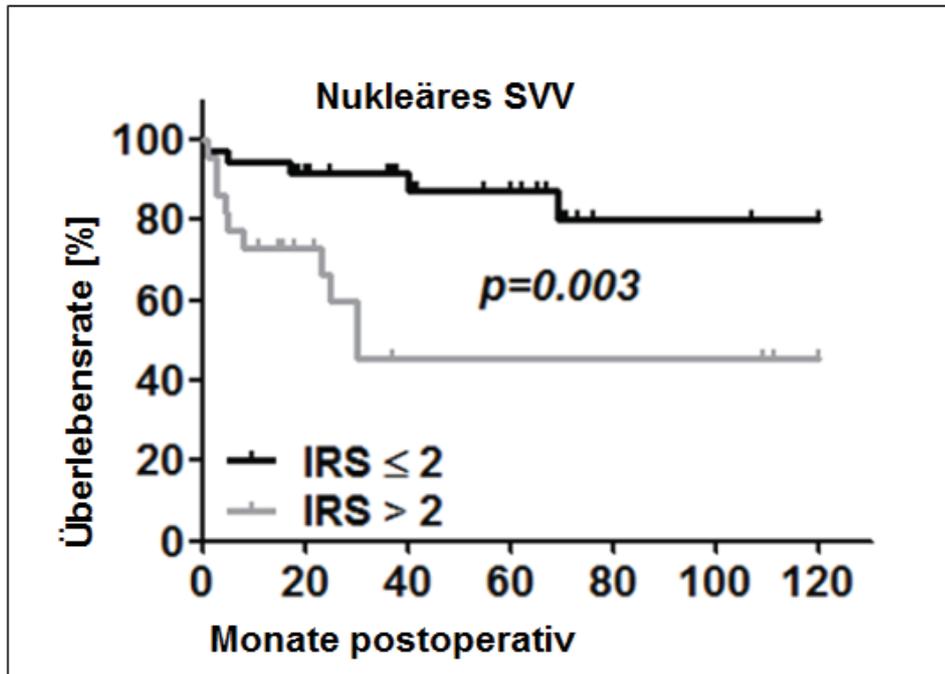


Abb. 7: Kaplan Meier Analyse: Nukleäre Survivin (SVV) - Expression.

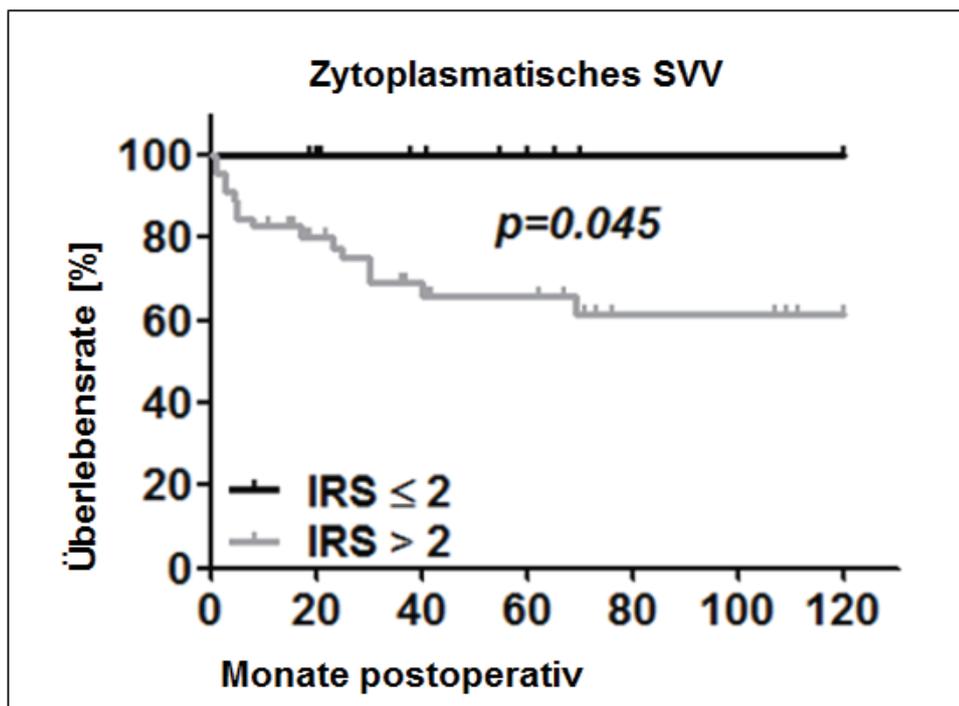


Abb. 8: Kaplan Meier Analyse: Zytoplasmatische Survivin (SVV) - Expression.

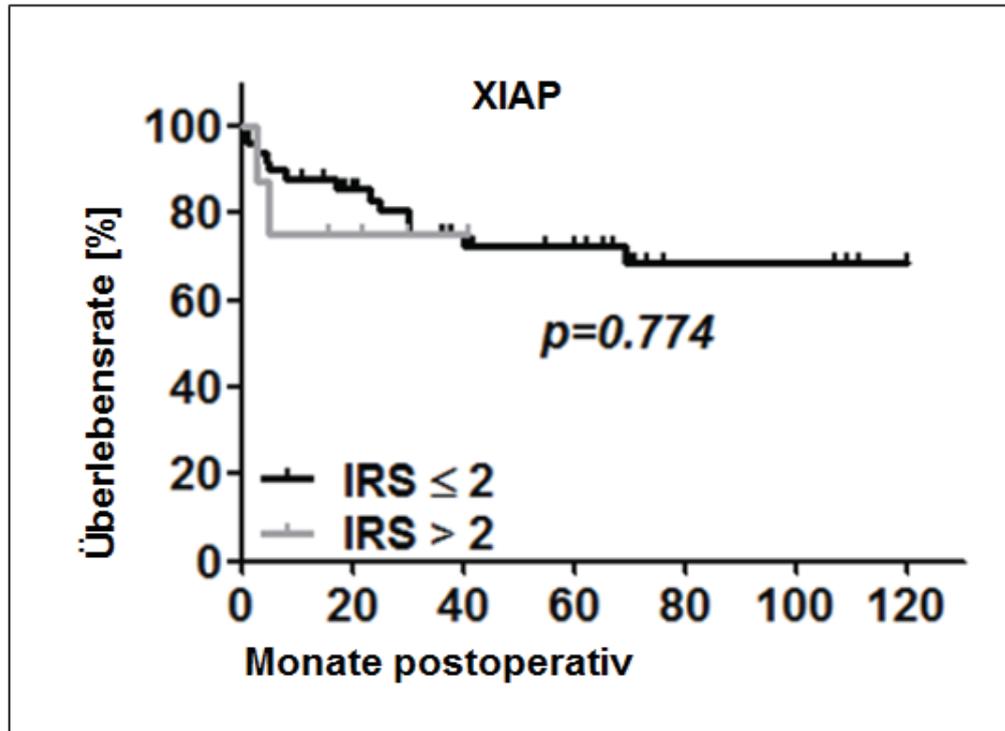


Abb. 9: Kaplan Meier Analyse: XIAP- Expression (nur zytoplasmatisch).

Tabelle 17: Univariate Analyse des Zusammenhanges von klinisch pathologischen Variablen sowie der IAP Expression (Survivin und XIAP) mit dem Gesamtüberleben von Patientin mit GEP-NEN

Overall Survival: Univariate Analyse

Variable	Patienten (n)	HR	95% CI (lower-upper)	p-value
Alter				
≤ median	28	1		
> median	29	2.524	0.854 - 7.464	0.082
Geschlecht				
Weiblich	28	1		
Männlich	29	0.789	0.280 - 2.221	0.652
Tumorstadium				
T1-T2	25	1		
T3-T4	29	3.622	0.992 - 13.215	0.036
Lymphknotenmet.				
N0	30	1		
N+	26	7.711	1.725 - 34.470	0.001
Grading				
G1-G2	43	1		
G3	14	9.585	2.909 - 31.585	< 0.001
Metastasierung				
M0	42	1		
M+	15	3.001	1.085 - 8.302	0.026
Survivin-Expression (nuc.)				
IRS ≤ 2	35	1		
IRS > 2	22	4.519	1.526 - 13.387	0.003
Survivin-Expression (cyt.)				
IRS ≤ 2	11	1		
IRS > 2	46	29.210	0.139 - open	0.045
XIAP-Expression				
IRS ≤ 2	49	1		
IRS >2	8	1.245	0.277 - 5.600	0.774

Tabelle: 18: Multivariate Analyse des Zusammenhanges von klinisch pathologischen Variablen sowie der IAP Expression (Survivin und XIAP) mit dem Gesamtüberleben von Patientin mit GEP-NEN

Variable	Patienten (n)	HR	95% CI (lower-upper)	p-value
<i>Grading</i>				
G1-G2	43	1		
G3	14	5.211	1.457 – 18.636	0.011
<i>Lymphknotenmet.</i>				
N0	30	1		
N+	26	11.704	1.486 - 92.156	0.019
Overall Survival: Multivariate Analyse				

Die Tabellen 16 bis 20 sowie die Abbildungen sechs bis acht sind modifiziert nach Dizdar, Oesterwind et al (Dizdar, Oesterwind et al. 2017).

4.2 Expression der Inhibitor of Apoptosis Proteins in NEC-DUE Zelllinien

Zunächst wurde die Expression der IAPs Survivin und XIAP in unseren GEP-NEC Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 mit verschiedenen Methoden untersucht. Die Expression weiterer typischer neuroendokriner Marker wurde bereits in unserem Labor nachgewiesen, als die Zelllinien etabliert wurden: Hier konnte unter anderem der Nachweis der Expression von Synaptophysin, Chromogranin A, VMAT1 und 2 (*vesicular monoamine transporters*), Somatostatin-Rezeptor, Zytokeratin sowie epithelialen Markern wie CEA und Ca19.9 erfolgen (Krieg, Mersch et al. 2014).

Zunächst wurde die Expression der IAPs mittels Western Blot untersucht. Zur Ladekontrolle wurden ubiquitär exprimierte Proteine wie alpha-Tubulin sowie GAPDH verwendet. Des Weiteren wurde die Expression der Proteine auf RNA-Ebene mittels quantitativer Real-Time-PCR überprüft.

Es zeigte sich sowohl im Western Blot als auch in der PCR eine starke Expression von Survivin und XIAP in beiden Zelllinien, wobei Survivin vermehrt in der Zelllinie NEC-DUE1 und XIAP vermehrt in der Zelllinie NEC-DUE2 nachweisbar waren (Abbildung 9). Weitere Mitglieder der IAP-Familie wie cIAP1 und 2 wurden in beiden Zelllinien weniger stark exprimiert.

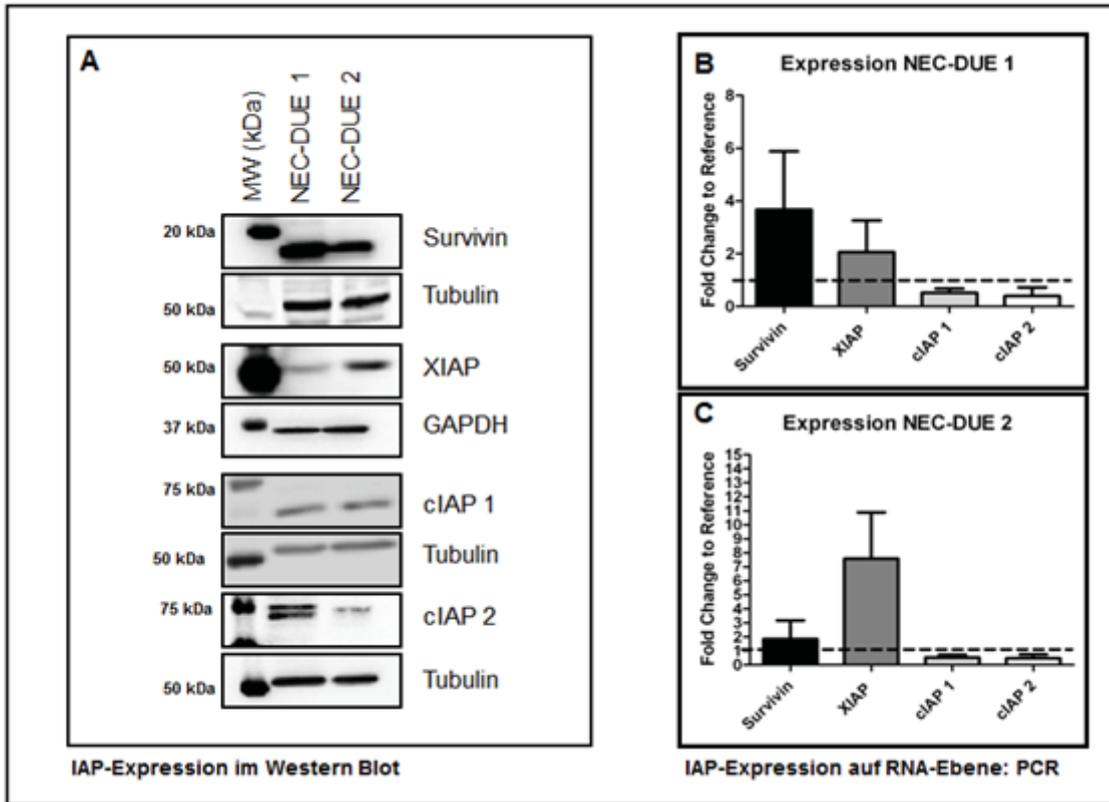


Abb. 10: A: Protein-Expression der IAPs Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in GEP-NEC-Zelllinien; Ladekontrollen im Westernblot: Tubulin für Survivin, GAPDH für XIAP
 B: mRNA Expression der IAPs Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in der NEC-DUE1 Zelllinie
 C: mRNA Expression der IAPs Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in der NEC-DUE2 Zelllinie
 MW = *molecular weight*, kDa = kiloDalton; *Fold change to reference*: Änderung im Vgl. zur Kontrolle

Zudem erfolgte zur besseren Visualisierung eine Immunfluoreszenzfärbung von Survivin in unseren GEP-NEC Zelllinien. Hierbei konnten wir in beiden Zelllinien sowohl eine nukleäre als auch zytoplasmatische Expression von Survivin detektieren. (Abbildungen 11 und 12).

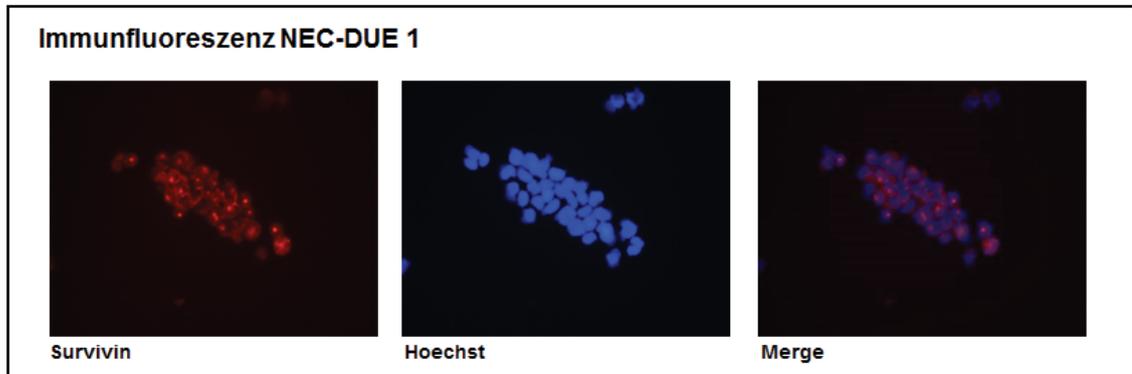


Abb. 11: Immunfluoreszenzfärbung NEC-DUE1 mit Survivin und Hoechst-Kernfärbung (Latt, Stetten et al. 1975) sowie Überlagerung („Merge“) beider Bilder zur besseren Darstellung der Lokalisation von Survivin in den Zellen; aufgenommen mit Leica Application Suite



Abb. 12: Immunfluoreszenzfärbung NEC-DUE2 mit Survivin und Hoechst-Kernfärbung (Latt, Stetten et al. 1975) sowie Überlagerung („Merge“) beider Bilder zur besseren Darstellung der Lokalisation von Survivin in den Zellen, aufgenommen mit Leica Application Suite

4.3 Effekt von YM155 und M4N auf die Proteinexpression von GEP-NEC

Zelllinien

Es ist bekannt, dass durch YM155 oder M4N die Transkription von Survivin und damit auch die Proteinexpression inhibiert werden. Die NEC-Zellen wurden daher wie im Methodenabschnitt beschrieben jeweils für 24 Stunden mit den *Compounds* behandelt. Nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von YM155 konnte in der vorliegenden Arbeit eine verminderte Expression von Survivin nachgewiesen werden (Abb. 13 und 15). Ebenfalls ließ sich dies nach Applikation von M4N zeigen (Abb. 14 und 16).

Als Ladekontrolle wurden im Western Blot ubiquitär exprimierte Proteine wie GAPDH und alpha-Tubulin verwendet, die jeweils eine konstante Expression aufwiesen.

Im Western Blot wurde zusätzlich die Expression weiterer Proteine der IAP-Familie an den identischen Proben untersucht. Hier zeigte sich für YM155 eine konstante Expression von XIAP sowie cIAP2 in beiden Zelllinien, sowie eine konzentrationsabhängig verminderte Expression von cIAP1 in der Zelllinie NEC-DUE1, jedoch nicht in der NEC-DUE2 Zelllinie (Abbildung 13 und 15).

Nach der Behandlung mit M4N zeigten sich in beiden Zelllinien eine konstante Expression aller weiteren untersuchten Proteine (Abbildungen 14 und 16).

Wir untersuchten zusätzlich die Spaltung der Poly ADP-Ribose Polymerase-1 (PARP), die als Zeichen der Apoptoseinduktion zu werten ist. PARP wird durch Caspase-3 gespalten (Simbulan-Rosenthal, Rosenthal et al. 1998), somit besteht mit dem Nachweis von gespaltenener PARP indirekt ein Nachweis für die Aktivität von Caspase-3 und somit eine Apoptoseinduktion.

Nach Behandlung mit YM155 konnte in der Zelllinie NEC-DUE 1 keine PARP-Spaltung nachgewiesen werden, während sich bei der NEC-DUE 2 Zelllinie eine PARP-Spaltung nachweisen ließ. Nach Behandlung beider Zelllinien mit M4N zeigte sich ebenfalls keine PARP-Spaltung (Abbildung 17).

NEC DUE 1 YM-155 24h

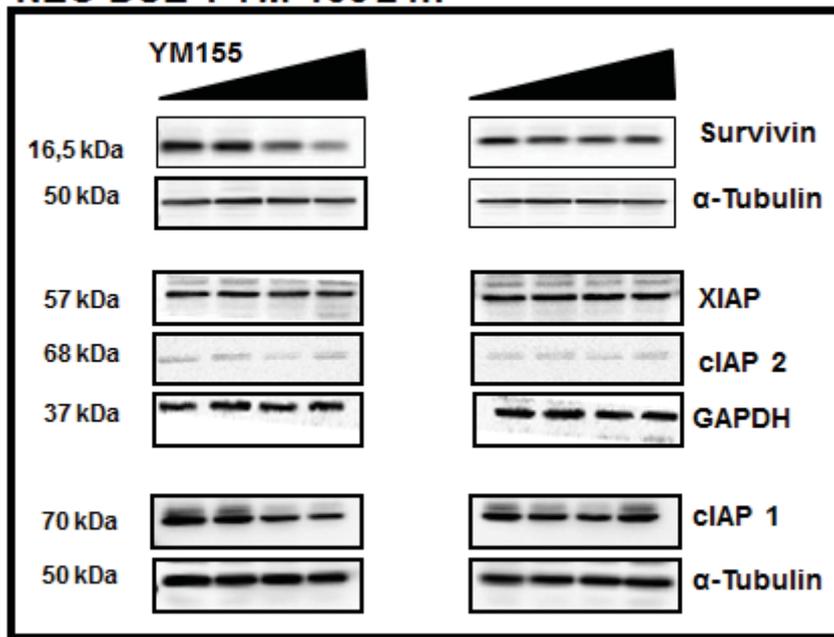


Abb. 13: Proteinexpression von Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in der Zelllinie NEC-DUE1 nach Behandlung mit YM155 in steigender Konzentration (10, 30, 100, 300 nM, aufsteigend von links nach rechts). Ladekontrolle: Tubulin, GAPDH. Inkubationszeit: 24 Stunden.

NEC DUE 1 M4N 24h

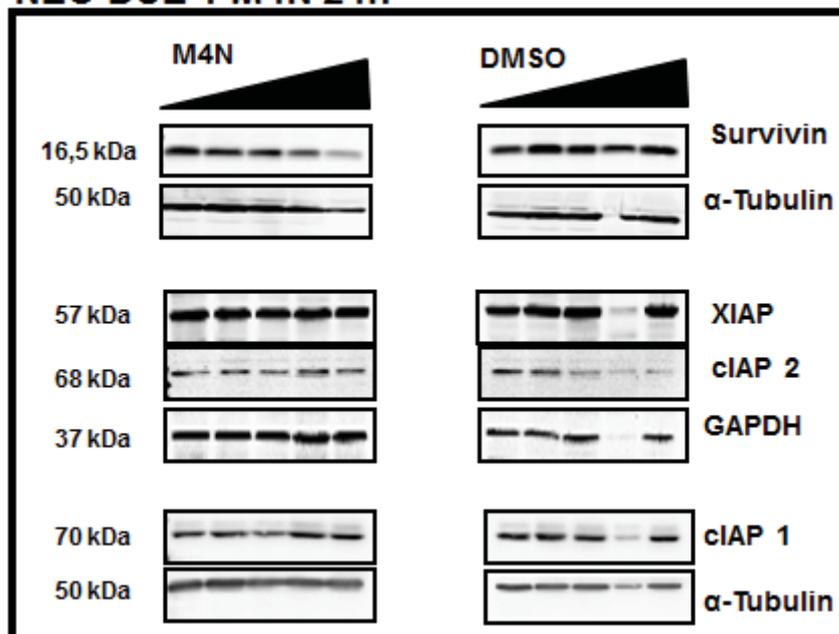


Abb. 14: Proteinexpression von Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in der Zelllinie NEC-DUE1 nach Behandlung mit M4N in steigender Konzentration (0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, aufsteigend von links nach rechts). Ladekontrolle: Tubulin, GAPDH. Inkubationszeit: 24 Stunden.

NEC DUE 2 YM155 24h

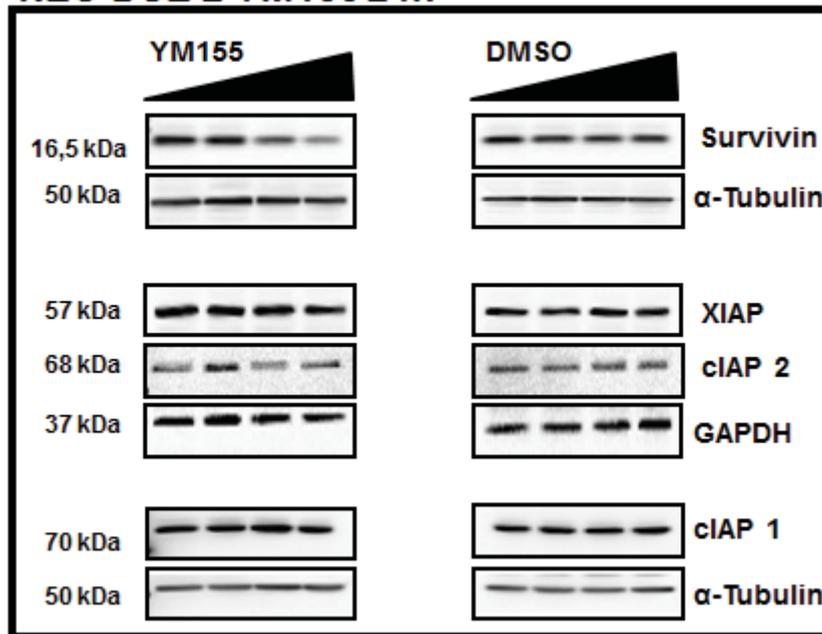


Abb. 15: Proteinexpression von Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in der Zelllinie NEC-DUE2 nach Behandlung mit YM155 in steigender Konzentration (10, 30, 100, 300 nM, aufsteigend von links nach rechts). Ladekontrolle: Tubulin, GAPDH. Inkubationszeit: 24 Stunden.

NEC DUE 2 M4N 24h

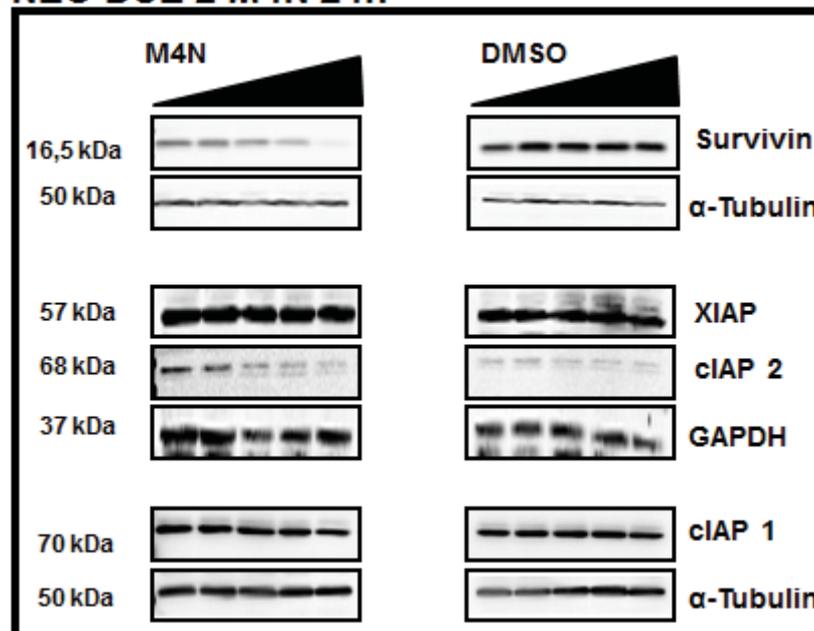


Abb. 16: Proteinexpression von Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in der Zelllinie NEC-DUE2 nach Behandlung mit M4N in steigender Konzentration (0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, aufsteigend von links nach rechts). Ladekontrolle: Tubulin, GAPDH. Inkubationszeit: 24 Stunden.

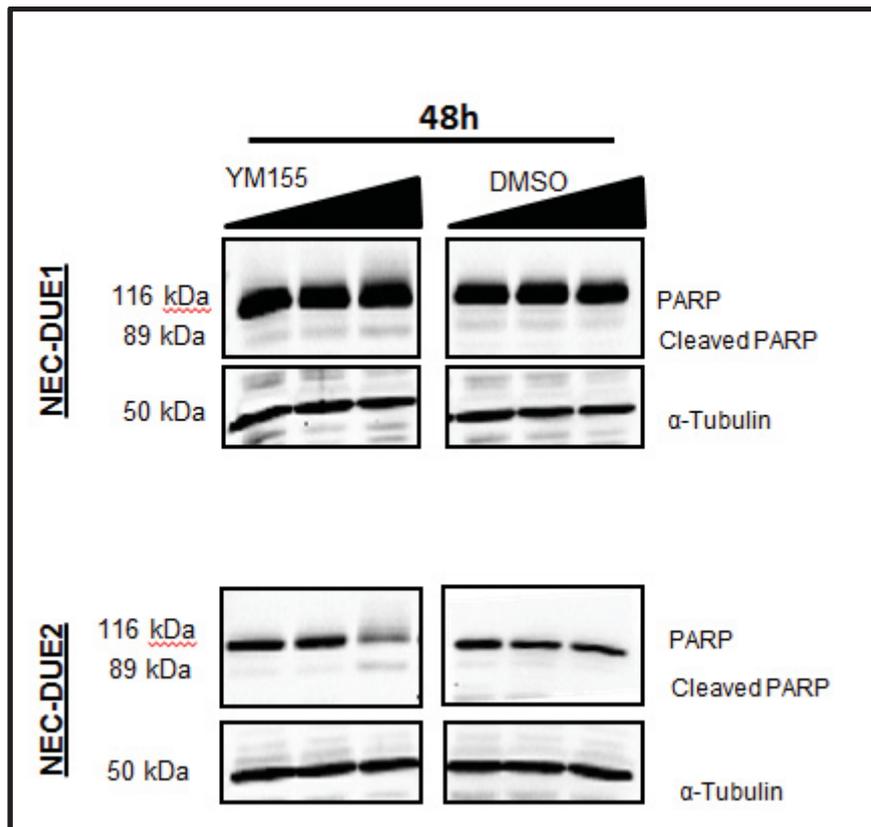


Abb. 17: Expression von PARP und seinem Spaltprodukt („*Cleaved PARP*“) in NEC-DUE1 und NEC-DUE2-Zellen nach Behandlung mit YM155 in steigender Konzentration sowie DMSO als Kontrolle: Nachweis einer PARP-Spaltung für NEC-DUE2. Tubulin diente als Ladekontrolle. Inkubationszeit mit YM155 und DMSO: 48 Stunden.

4.4 Analyse der Auswirkungen einer pharmakologischen Survivin-inhibition mit YM155 oder M4N auf die Viabilität, Proliferation und Apoptoseaktivität von GEP-NEC Zelllinien

Es erfolgten ein MTS-Assay zur Darstellung der Zellviabilität und ein BrdU-Assay zur Beurteilung der Proliferation der Zellen. Alle Versuche wurden in unabhängigen Ansätzen mindestens dreimal durchgeführt. Die Zellen wurden über 48 und 96 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen von YM155 sowie M4N oder DMSO (Lösungsmittel) in gleicher Konzentration als Kontrolle versetzt. Es zeigte sich eine signifikante konzentrationsabhängige Minderung der Zellviabilität und Proliferation in beiden Zelllinien für YM155 und M4N (Abbildungen 17 bis 19).

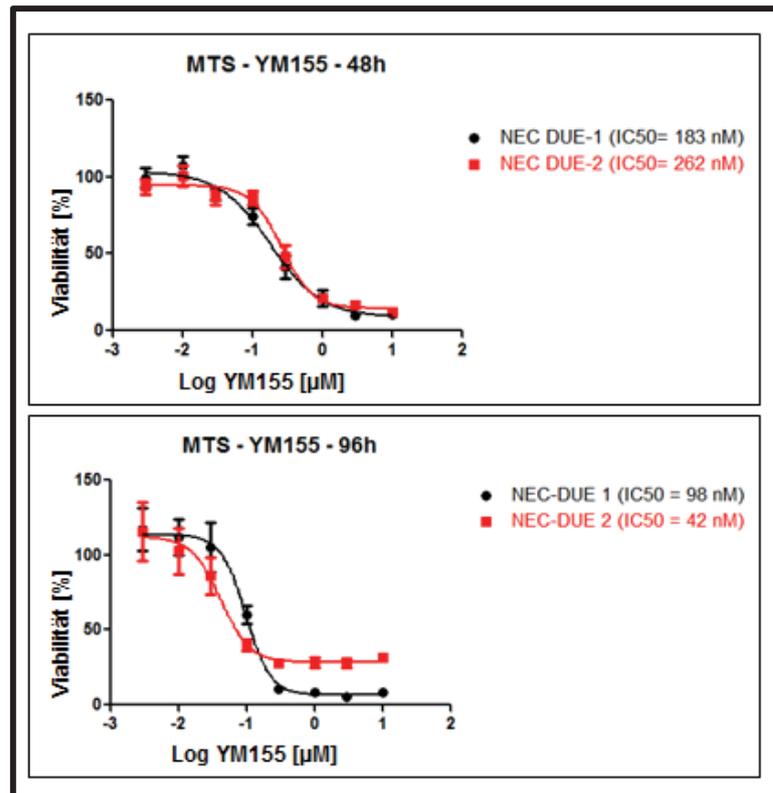


Abb. 18: Abnahme der Zellviabilität nach Behandlung mit YM155 für 48 und 96 Stunden im MTS-Assay und Darstellung der mittleren inhibitorischen Konzentration für NEC-DUE1 und NEC-DUE2.

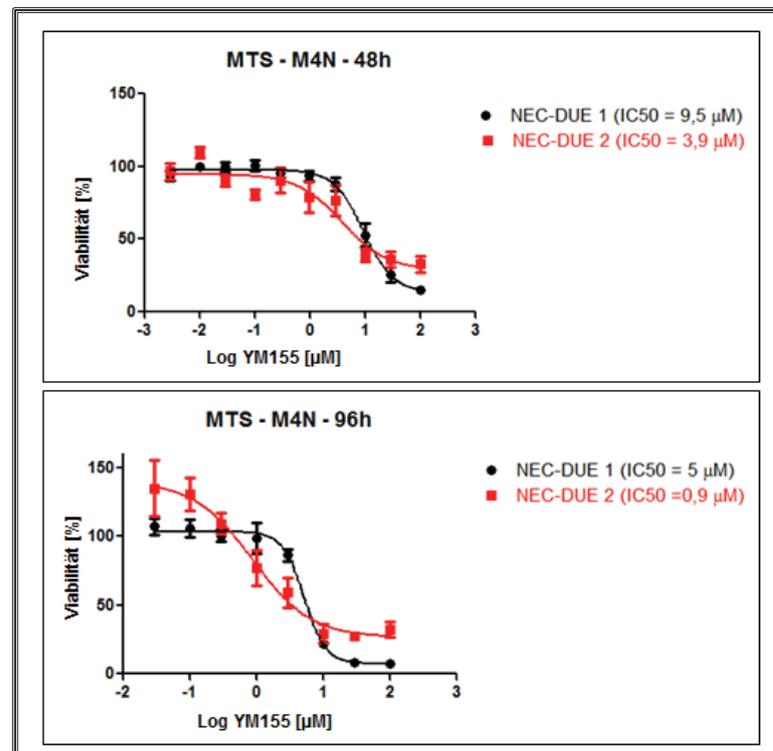


Abb. 19: Abnahme der Zellviabilität nach Behandlung mit M4N für 48 und 96 Stunden im MTS-Assay und Darstellung der mittleren inhibitorischen Konzentration für NEC-DUE1 und NEC-DUE2.

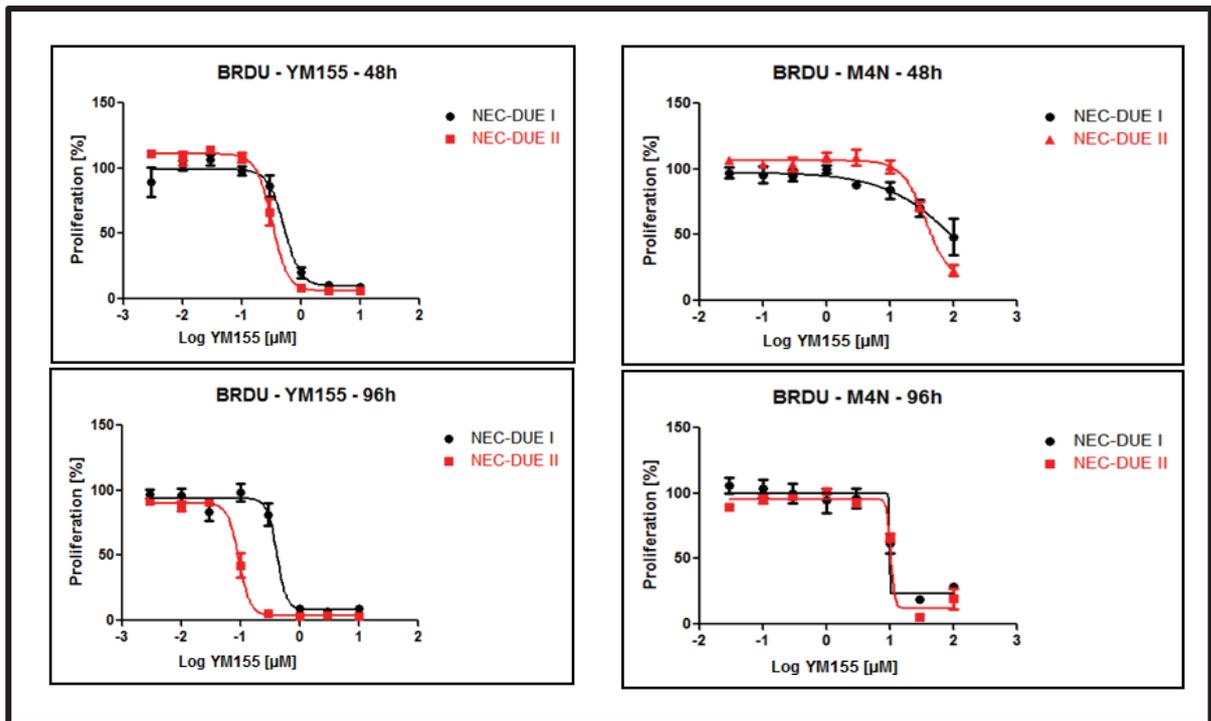


Abb. 20: Abnahme der Proliferation der Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 nach 48 und 96 stündiger Inkubation im BrdU-Assay nach Behandlung mit YM155 und M4N.

Nach Behandlung unserer GEP-NEC Zelllinien mit den Survivin-Antagonisten YM155 und M4N wurde die Caspasen-Aktivität mittels Caspase-3/7-Glo-Assay analysiert. Die Behandlung mit YM155 führte in beiden Zelllinien zu einer dosisabhängig gesteigerten Caspase-Aktivität. Eine gesteigerte Caspasen-Aktivität konnte bereits nach zweistündiger Behandlung mit YM155 erreicht werden (Abbildung 21).

Nach Behandlung mit M4N ließ sich in keiner der beiden Zelllinien eine signifikant erhöhte Caspase-Aktivität nachweisen (Abbildung 22). Auch hier wurden alle Versuche dreimal in unabhängigen Versuchsserien durchgeführt.

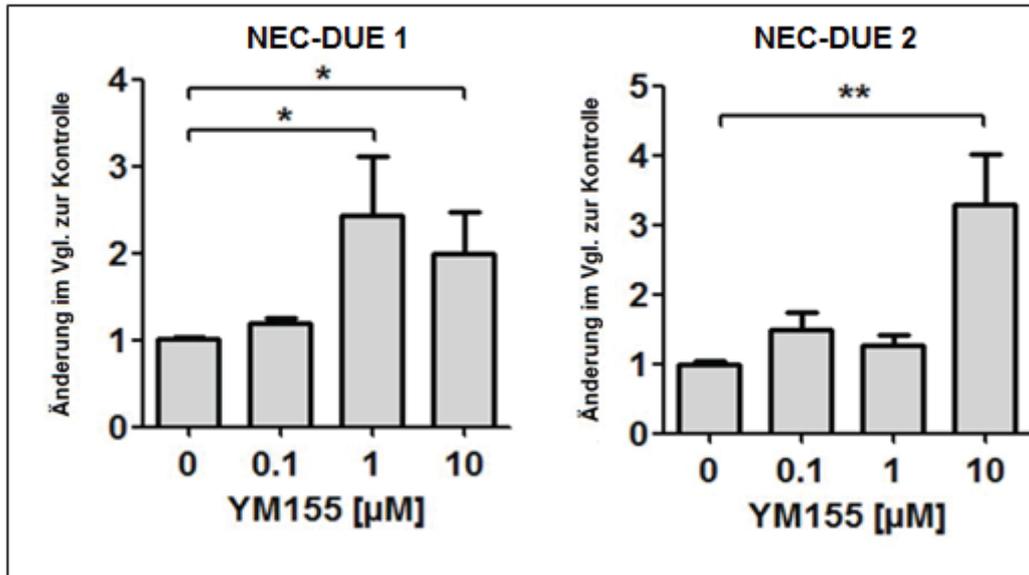


Abb. 21: Caspase-3/7-Aktivität in NEC-DUE Zelllinien nach Behandlung mit YM155 in aufsteigenden Konzentrationen nach zwei Stunden Inkubationszeit. Signifikanzniveau angegeben mit Sternchen: * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-Test.

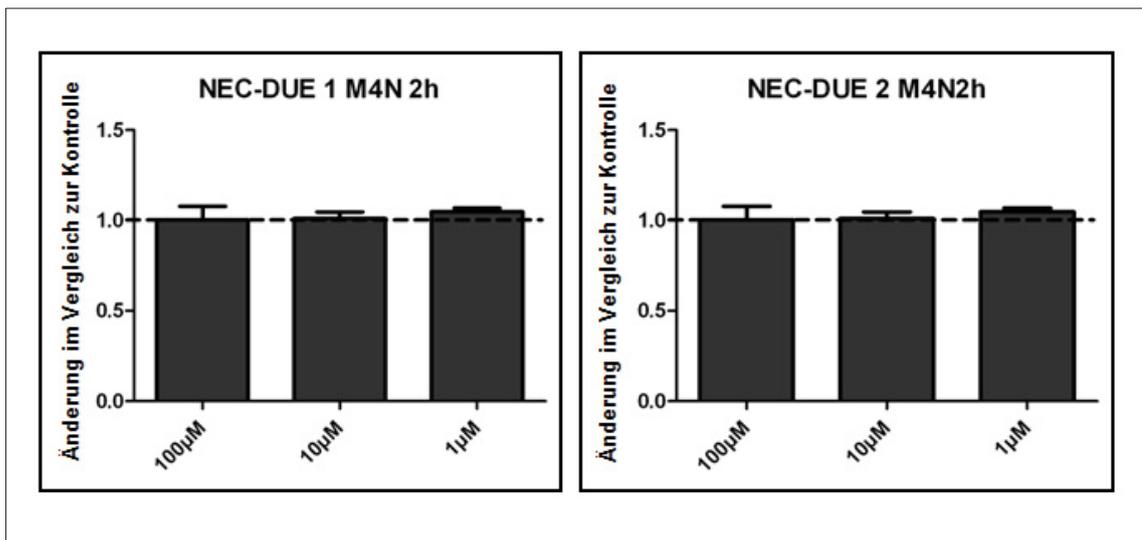


Abb. 22: Caspase-3/7-Aktivität in NEC-DUE Zelllinien nach Behandlung mit M4N nach zwei und sechs Stunden Inkubationszeit: Keine Änderung der Caspase-Aktivität.

4.5 Analyse der Auswirkungen einer pharmakologischen XIAP-Inhibition mit GDC-0152 und Birinapant auf die Viabilität von GEP-NEC Zelllinien

Die Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 wurden für 48 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen der XIAP-Inhibitoren Birinapant und GDC-0152 behandelt, hier zeigte sich keine Abnahme der Zellviabilität (Abbildungen 23 und 24). Daher wurden keine weiteren Versuche mit den beiden *Compounds* an diesen Zelllinien durchgeführt.

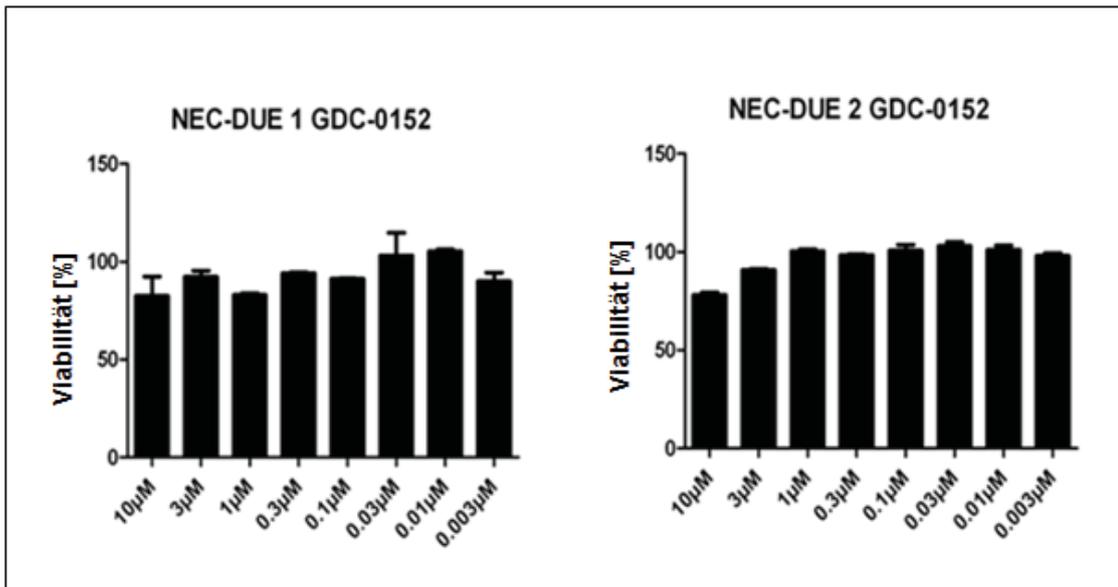


Abb. 23: Viabilität der Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 im MTS-Assay nach Behandlung mit GDC-0152, Inkubationszeit 48 Stunden

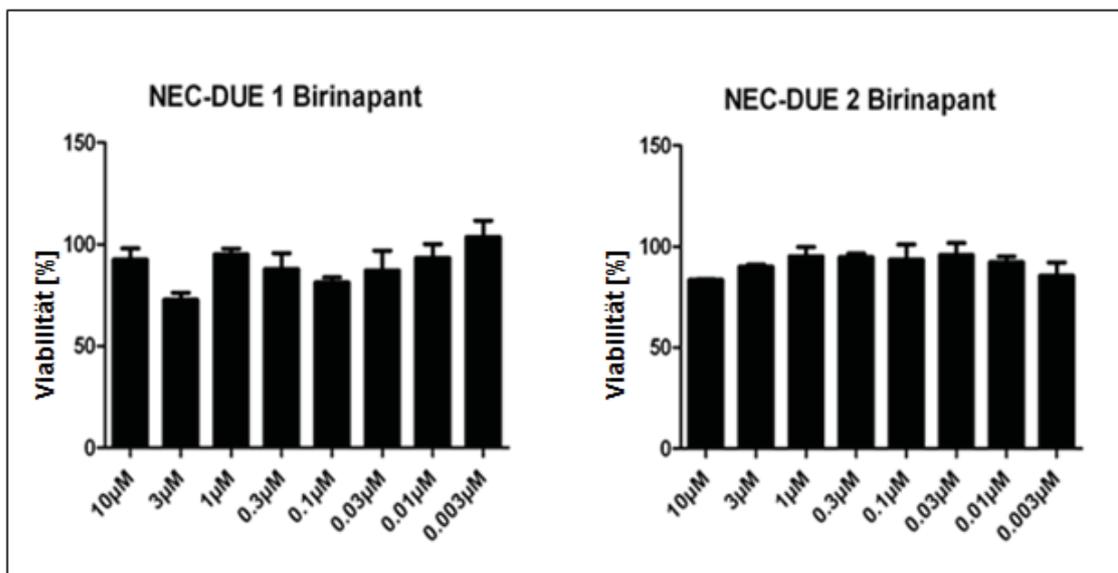


Abb. 24: Viabilität der Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 im MTS-Assay nach Behandlung mit Birinapant, Inkubationszeit 48 Stunden

5 Diskussion

5.1 Die Inhibitor of Apoptosis Proteine Survivin und XIAP in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien

Die Inhibitor of Apoptosis Proteine Survivin und XIAP sind an der Regulation von für Krebszellen essentiellen biologischen Funktionen wie Apoptose, Proliferation und Metastasierung beteiligt und gelten als vielversprechende Zielstrukturen für die Behandlung maligner Erkrankungen (Liston, Roy et al. 1996, Lladser, Sanhueza et al. 2011). Ob diese Proteine auch für neue Therapiekonzepte im Rahmen der Behandlung von GEP-NECs genutzt werden können, ist bislang nicht erforscht. Vereinzelte Publikationen weisen jedoch auf eine potentielle Bedeutung der IAPs im Rahmen der Entstehung von GEP-NENs hin. So beobachteten Tonnies et al. (Tonnies, Toliat et al. 2001) in NENs des Mitteldarmes gehäuft Amplifikationen des Chromosomen-Abschnittes 17q, auf dem das Survivin-Gen lokalisiert ist. Darüber hinaus beobachteten Grabowski et al. (Grabowski, Griss et al. 2005), dass die nukleäre Expression von Survivin in einer Subgruppe von GEP-NENs mit einer schlechten Prognose verbunden ist. Da die im Rahmen dieser Untersuchung eingeschlossenen Patienten jedoch nicht entsprechend der 2010 veröffentlichten WHO-Klassifikation eingeteilt wurden, besitzt diese Studie eine wesentliche Limitation. Darüber hinaus erfolgte keine Korrelation mit klinisch pathologischen Parametern. Von der Gruppe um Grabowski et al. existiert zudem eine Folgearbeit aus dem Jahre 2018, in der eine hohe nukleäre Survivin Expression in G3-NEC demonstriert werden konnte (Briest, Wang et al. 2018). Das Expressionsverhalten von XIAP in GEP-NEN wurde bislang noch nicht analysiert.

Da bislang keine -beziehungsweise nur unzureichende- Untersuchungen des Expressionsverhaltens der beiden prominentesten Mitglieder der IAP Familie existierten, führten wir im Rahmen dieser Arbeit zunächst eine detaillierte Analyse der Survivin und XIAP Expression in einem großen Kollektiv von Gewebeproben gastroenteropankreatischer neuroendokriner Neoplasien durch.

Hierbei erbrachte die Korrelation der Proteinexpressionslevel mit klinischen und pathologischen Parametern zwei interessante Ergebnisse. Zum einen detektierten wir entsprechend seiner essentiellen Funktion im Rahmen der Mitose signifikant erhöhte Survivin Expressionslevel in G3 NECs mit hoher mitotischer Aktivität. Als wichtiger

Bestandteil des CPC (*chromosomal passenger complex*) (Jeyapakash, Klein et al. 2007) scheint Survivin demnach insbesondere an der unkontrollierten Proliferation der aggressiven GEP-NECs beteiligt zu sein. Zum anderen zeigte sich eine signifikante Assoziation zwischen hoher XIAP Expression und fortgeschrittenen Tumorstadien. Dies könnte auf eine Funktion des Proteins im Rahmen der Progression gastroenteropankreatischer Neoplasien hinweisen.

5.2 Survivin und XIAP als prognostische Marker in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien

Survivin wurde bereits in zahlreichen Studien und verschiedenen Malignomen als vielversprechender Prognosemarker deklariert. So wurde Survivin bereits mehrfach mit einer schlechten Prognose bei Patienten mit Mammakarzinom assoziiert (Dang, Reddy et al. 2017). Zudem konnte das Protein als negativer Prognosemarker beim Schilddrüsenkarzinom identifiziert werden (Vandghanooni, Eskandani et al. 2011, Werner, Tamkan-Olcek et al. 2016). Auch für das Blasenkarzinom zeigt sich Survivin als diagnostischer Marker mit hoher Spezifität (Eissa, Badr et al. 2013), die klinische Anwendung hat sich jedoch bislang noch nicht etabliert. Wie bereits erwähnt, beschrieben Grabowski et al. Im Jahr 2005 erstmals, dass die nukleäre Expression von Survivin in einer Subgruppe von GEP-NENs mit einer schlechten Prognose verbunden ist. Die prognostische Bedeutung der XIAP Expression in GEP-NENs wurde bislang nicht analysiert. Im Rahmen anderer maligner Erkrankungen hat sich XIAP jedoch auch als vielversprechender Prognosemarker erwiesen. So zeigte sich bei hoher XIAP Expression in kolorektalen Karzinomen ein schlechteres Ansprechen auf Chemotherapie, was mit einem schlechteren Überleben der Patienten verbunden war (Flanagan, Kehoe et al. 2015). Zudem konnte eine erhöhte XIAP Expression in Nierenzellkarzinomen (Yan, Mahotka et al. 2004), bei myeloischer Leukämie (Tamm, Kornblau et al. 2000) und im Prostatakarzinom (Seligson, Hongo et al. 2007) mit einer schlechten Prognose assoziiert werden.

Um die prognostische Relevanz der Survivin und XIAP Expression in unserem Kollektiv aus GEP-NEN Patienten zu analysieren, führten wir eine detaillierte Überlebensanalyse durch. Während in der univariaten Kaplan Meier Analyse ein signifikanter Zusammenhang zwischen hoher Survivinexpression und einem schlechten

Überleben der Patienten bestand, bestätigte die abschließende multivariate logistische Regressionsanalyse ausschließlich das proliferationsbasierte *Grading* (G1/G2 vs. G3) sowie den Lymphknotenstatus der Patienten (pN0 vs. pN+) als unabhängige Prognosefaktoren. Die Bestätigung einer hohen Survivinexpression als Prognosemarker in der multivariaten Analyse könnte hierbei durch die signifikante Assoziation zwischen der Survivin Proteinexpression und dem proliferationsbasierten *Grading* verhindert worden sein. Die XIAP Expression zeigte weder in der univariaten noch der multivariaten Überlebensanalyse einen Zusammenhang mit der Prognose der Patienten.

5.3 Survivin in der Therapie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Karzinome

Die mit dem *Grading* korrelierende Expression von Survivin ist ein Hinweis darauf, dass das Protein eine wichtige Rolle im Rahmen der Tumorprogression und Tumorzellproliferation von GEP-NEN spielt.

Es zeigte sich nach Inhibition von Survivin eine Reduktion der Zellviabilität sowie der Proliferation, ebenfalls konnten wir eine Caspase-Aktivierung und PARP Spaltung nachweisen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Survivin eine zentrale Rolle in der Progression gastroenteropankreatischer neuroendokriner Karzinome spielt, da es an der Regulation essentieller zellulärer Funktionen wie Proliferation und Apoptose beteiligt ist.

Die mittlere inhibitorische Konzentration nach Behandlung mit YM155 lag im MTS-Assay für die Zelllinie NEC-DUE1 nach 48 Stunden Inkubationszeit bei 183nM und nach 96 Stunden bei 98nM und für die Zelllinie NEC-DUE2 nach 48 Stunden bei 262nM und nach 96 Stunden bei 45nM. Im BrdU-Assay lagen die mittleren Hemmkonzentrationen für NEC-DUE1 nach 48 Stunden bei 519nM bzw. nach 96 Stunden bei 417nM und für die Zelllinie NEC-DUE2 nach 48 Stunden Behandlung bei 309nM und nach 96 Stunden bei 95nM. Diese Werte sind im Vergleich zu anderen Tumorentitäten hoch. So wurden in Ösophaguskarzinom-Zelllinien beispielsweise mittlere Hemmkonzentrationen von 4.6 bis 23.5 nM nachgewiesen (Dizdar, Junemann et al. 2018) und im follikulären Schilddrüsenkarzinom von 1.3nM bis 30nM (Werner, Nolten et al. 2018). Für das multiple Myelom wurden ebenfalls niedrigere mittlere Hemmkonzentrationen von unter 10nM nachgewiesen (Ookura, Fujii et al. 2017). In in

vivo Experimenten unter Verwendung immunkompromittierter Mäuse konnte jedoch demonstriert werden, dass die Gabe von für den Menschen tolerablen YM155 Dosen das Wachstum von GEP-NEC Xenografts signifikant reduzierte (Dizdar, Oesterwind et al. 2017). Analog scheinen die für eine effektive Behandlung gastroenteropankreatischer neuroendokriner Karzinome erforderlichen YM155 Dosen im therapeutisch anwendbaren Bereich zu liegen. In der genannten Arbeit wurden Tumorzellen der GEP-NEC Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 subkutan in die Flanke immunkompromittierter Mäuse injiziert. Sobald die Tumore eine Größe von 200 bis 300 mm³ erreicht hatten, wurden die Tiere mit YM155 oder NaCl als Kontrolle behandelt. Nachdem eine kritische Größe der Xenografts der Kontrollgruppe erreicht wurde, wurde das Experiment beendet und die Tumore gewogen und gemessen. In der mit YM155 behandelten Gruppe zeigte sich eine signifikante Größen- und Gewichtsreduktion der GEP-NEC Xenografts (Dizdar, Oesterwind et al. 2017).

Angesichts dieser vielversprechenden präklinischen Ergebnisse wäre nun eine Evaluation der Wirksamkeit von YM155 bei Patienten mit GEP-NECs in Phase-II-Studien wünschenswert. Bei anderen Malignomen wie dem Prostata- oder nicht kleinzelligem Lungenkarzinom sind derartige Studien nach ebenfalls sehr vielversprechenden präklinischen Ergebnissen bereits durchgeführt worden. Im Rahmen dieser Untersuchungen zeigte YM155 als Monotherapie jedoch nur eine begrenzte Wirksamkeit (Tolcher, Mita et al. 2008, Giaccone, Zatloukal et al. 2009). So konnten Tolcher et al. Bei Patienten mit kastrationsresistentem Prostatakarzinom unter Behandlung mit YM155 eine Verlängerung einer *stable disease* bei 25 % der Patienten nachweisen. Giaccone et al. analysierten die Auswirkungen einer YM155 Monotherapie bei Patienten mit fortgeschrittenem nicht kleinzelligem Lungenkarzinom und beobachteten bei 5.4 % der Patienten ein partielles Ansprechen sowie bei 37.8 % der Patienten eine *stable disease*. Aufgrund dieser ernüchternden Ergebnisse wird in neueren Studien die Effektivität von YM155 im Rahmen von Kombinationstherapien z.B. mit Chemotherapeutika analysiert (Kelly, Thomas et al. 2013, Papadopoulos, Lopez-Jimenez et al. 2016).

In einer multizentrischen Studie zeigte sich bei Patienten mit fortgeschrittenem B-Zell-Lymphom unter Gabe einer Kombinationstherapie aus YM155 und Rituximab ein Rückgang der Tumormasse. Die Nebenwirkungen waren vergleichsweise gering. Die

Applikation von YM155 erfolgte über Infusionspumpen, die alternierend für sieben Tage verwendet wurden (Papadopoulos, Lopez-Jimenez et al. 2016). In einer Studie bei Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenzellkarzinom konnte bei Gabe einer Kombinationstherapie mit YM155 sowie Cisplatin und Paclitaxel jedoch keine Verbesserung des Therapieansprechens oder Überlebens erreicht werden. Es zeigte sich jedoch ebenfalls ein geringes Nebenwirkungsprofil (Kelly, Thomas et al. 2013).

Bei all diesen Studien muss bedacht werden, dass es sich um sehr selektiv ausgewählte und kleine Patientenkollektive handelte. Eingeschlossen wurden ausschließlich Patienten mit fortgeschrittenen Malignomen, die sich refraktär gegenüber der aktuellen Standardtherapie gezeigt hatten. Insofern sollte die Tatsache, dass in den meisten dieser Untersuchungen nur eine geringe Wirksamkeit des Survivinantagonisten YM155 festgestellt werden konnte, nicht die Durchführung weiterer klinischer Studien verhindern.

5.4 XIAP in der Therapie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Karzinome

Ähnlich wie für Survivin konnte auch für XIAP eine gegenüber Normalgewebe gesteigerte Expression in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden (Lu, Lin et al. 2007, Flanagan, Kehoe et al. 2015, Werner, Tamkan-Olcek et al. 2016). Zudem erwies sich XIAP als vielversprechender Prognosemarker bei Patienten mit klarzelligem Nierenzellkarzinom (Yan, Mahotka et al. 2004), akuter myeloischer Leukämie (Tamm, Kornblau et al. 2000) oder Ösophaguskarzinomen (Dizdar, Junemann et al. 2018). Diese Beobachtungen sowie die wichtige Funktion im Rahmen von für Malignome essentiellen biologischen Mechanismen wie Apoptose und Metastasierung führten zur Entwicklung pharmakologischer XIAP Inhibitoren (Flygare, Beresini et al. 2012, Krepler, Chunduru et al. 2013). Beim Großteil der bislang entwickelten XIAP Antagonisten handelt es sich um sogenannte SMAC-Mimetika, welche die Funktion des endogenen IAP Inhibitors SMAC imitieren (Allensworth, Sauer et al. 2013). Motiviert durch die Beobachtung, dass ein selektiver genetischer *Knock-Down* von XIAP in unseren GEP-NEC Zelllinien zu einer Reduktion der Tumorzellviabilität und Proliferation sowie einer Apoptoseinduktion führt (Dizdar, Oesterwind et al. 2017) behandelten wir die genannten Zelllinien mit den XIAP Antagonisten GDC-0152 und

Birinapant. Erstaunlicherweise bewirkten auch hohe Konzentrationen dieser SMAC-Mimetika keinerlei Reduktion der Viabilität unserer Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2.

Diese Diskrepanz zwischen fehlender Wirkung der verwendeten SMAC-Mimetika und deutlichen Effekten des genetischen *XIAP-Knock-Downs* beruht sehr wahrscheinlich auf Resistenzmechanismen gegen die aktuell erhältlichen pharmakologischen XIAP-Inhibitoren. Es wurden bereits mehrere verschiedene Resistenzmechanismen beschrieben. Diese beruhen unter anderem auf einer *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) vermittelten Hochregulation von c-IAP2, einem fehlerhaften Phosphatidylinositol-3 Kinase-Signalweg (PI3K) oder der Unfähigkeit, einen Ripoptosomenkomplex auszubilden (Petersen, Peyton et al. 2010, Maas, Tromp et al. 2013). Nur wenige humane Krebsarten zeigten bislang ein gutes Ansprechen auf die Gabe von SMAC-Mimetika als Monotherapie, so dass zurzeit verschiedene Kombinationstherapien mit Chemotherapeutika, Todesrezeptor-Agonisten, Kinaseinhibitoren oder Strahlentherapie evaluiert werden (Fulda 2015).

Ob die Kombination von SMAC-Mimetika mit Chemotherapeutika, Todesrezeptor-Agonisten oder Kinaseinhibitoren einen Therapieansatz für die Behandlung gastroenteropankreatischer neuroendokriner Karzinome darstellt, können wir nicht abschließend beurteilen. Diese Frage wird im Rahmen zukünftiger Untersuchungen beantwortet werden müssen.

6 Schlussfolgerung

GEP-NEN sind eine seltene und sehr heterogene Gruppe von Tumoren. Insbesondere für die niedrig differenzierten, großzelligen Karzinome sind noch keine zufriedenstellenden Therapien etabliert.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass die IAP-Mitglieder Survivin und XIAP eine wichtige Rolle in der Pathogenese und Proliferation dieser Tumoren spielen und somit potentielle Zielstrukturen für eine Therapie dieser Tumoren darstellen.

Wir untersuchten mittels Immunhistochemie die Expression von Survivin und XIAP in 77 Patientenproben und korrelierten diese mit klinisch pathologischen Faktoren. Hier konnten wir zeigen, dass eine XIAP-Überexpression mit fortgeschrittenen Tumorstadien assoziiert war. Survivin war vor allem in niedrig differenzierten, hoch malignen Tumoren überexprimiert. Somit können beide Proteine als prognostische Marker verwendet werden.

Wir liefern durch unsere in vitro-Versuche erste Hinweise darauf, dass Survivin ein potentielles Ziel für die Therapie von hoch malignen GEP-NEC darstellt. Der nächste Schritt sind nun klinische Studien mit Survivin-Antagonisten wie YM155 an Patienten.

7 Anhang: Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

Akerstrom, G., M. Falconi, R. Kianmanesh, P. Ruzsniwski and U. Plockinger (2009). "ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: pre- and perioperative therapy in patients with neuroendocrine tumors." Neuroendocrinology **90**(2): 203-208.

Allensworth, J. L., S. J. Sauer, H. K. Lyerly, M. A. Morse and G. R. Devi (2013). "Smac mimetic Birinapant induces apoptosis and enhances TRAIL potency in inflammatory breast cancer cells in an IAP-dependent and TNF-alpha-independent mechanism." Breast Cancer Res Treat **137**(2): 359-371.

Ambrosini, G., C. Adida and D. C. Altieri (1997). "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma." Nat Med **3**(8): 917-921.

Anlauf, M., P. Gerlach, M. Schott, A. Raffel, M. Krausch, W. T. Knoefel, M. Pavel and G. Kloppel (2011). "[Pathology of neuroendocrine neoplasms]." Chirurg **82**(7): 567-573.

Arnold, R., A. Rinke, C. Schmidt and L. Hofbauer (2005). "Endocrine tumours of the gastrointestinal tract: Chemotherapy." Best Pract Res Clin Gastroenterol **19**(4): 649-656.

Bosman, F. T., Carneiro, F., Hruban, R.H., Theise, N.D. (2010). WHO classification of tumours of the digestive system. France, Lyon : IARC Press, 2010.

Briest, F., Y. Wang, R. Arsenic, S. Elezkurtaj, E. Berg, S. Greshake, A. C. Lock, D. Horsch, C. N. Arnold, M. Hummel, B. Siegmund and P. Grabowski (2018). "Immunohistochemical Study of Mitosis-regulatory Proteins in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms." Anticancer Res **38**(7): 3863-3870.

Buffa, R., G. Rindi, F. Sessa, A. Gini, C. Capella, R. Jahn, F. Navone, P. De Camilli and E. Solcia (1987). "Synaptophysin immunoreactivity and small clear vesicles in neuroendocrine cells and related tumours." Mol Cell Probes **1**(4): 367-381.

Carlsen, E. A., N. Fazio, D. Granberg, S. Grozinsky-Glasberg, H. Ahmadzadehfar, C. M. Grana, W. T. Zandee, J. Cwikla, M. A. Walter, P. S. Oturai, A. Rinke, A. Weaver, A. Frilling, S. Gritti, A. K. Arveschoug, A. Meirovitz, U. Knigge and H. Sorbye (2019). "Peptide receptor radionuclide therapy in gastroenteropancreatic NEN G3: a multicenter cohort study." Endocr Relat Cancer **26**(2): 227-239.

Ceballos-Cancino, G., M. Espinosa, V. Maldonado and J. Melendez-Zajgla (2007). "Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin." Oncogene **26**(54): 7569-7575.

Chen, H., L. Teng, J. N. Li, R. Park, D. E. Mold, J. Gnabre, J. R. Hwu, W. N. Tseng and R. C. Huang (1998). "Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 2. Targeting herpes simplex virus replication by the mutation insensitive transcription inhibitor tetra-O-methyl-NDGA." J Med Chem **41**(16): 3001-3007.

Cheng, Q., X. Ling, A. Haller, T. Nakahara, K. Yamanaka, A. Kita, H. Koutoku, M. Takeuchi, M. G. Brattain and F. Li (2012). "Suppression of survivin promoter activity by YM155 involves disruption of Sp1-DNA interaction in the survivin core promoter." Int J Biochem Mol Biol **3**(2): 179-197.

Cives, M. and J. R. Strosberg (2018). "Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors." CA Cancer J Clin **68**(6): 471-487.

Dang, C. V., E. P. Reddy, K. M. Shokat and L. Soucek (2017). "Drugging the 'undruggable' cancer targets." Nat Rev Cancer **17**(8): 502-508.

Delle Fave, G., D. O'Toole, A. Sundin, B. Taal, P. Ferolla, J. K. Ramage, D. Ferone, T. Ito, W. Weber, Z. Zheng-Pei, W. W. De Herder, A. Pascher, P. Ruszniewski and p. all other Vienna Consensus Conference (2016). "ENETS Consensus Guidelines Update for Gastroduodenal Neuroendocrine Neoplasms." Neuroendocrinology **103**(2): 119-124.

Deveraux, Q. L., N. Roy, H. R. Stennicke, T. Van Arsdale, Q. Zhou, S. M. Srinivasula, E. S. Alnemri, G. S. Salvesen and J. C. Reed (1998). "IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases." EMBO J **17**(8): 2215-2223.

Dizdar, L., L. M. Junemann, T. A. Werner, P. E. Verde, S. E. Baldus, N. H. Stoecklein, W. T. Knoefel and A. Krieg (2018). "Clinicopathological and functional implications of the inhibitor of apoptosis proteins survivin and XIAP in esophageal cancer." Oncol Lett **15**(3): 3779-3789.

Dizdar, L., K. A. Oesterwind, J. C. Riemer, T. A. Werner, S. Mersch, B. Mohlendick, S. C. Schutte, P. E. Verde, K. Raba, S. A. Topp, N. H. Stoecklein, I. Esposito, W. T. Knoefel and A. Krieg (2017). "Preclinical assesement of survivin and XIAP as prognostic biomarkers and therapeutic targets in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasia." Oncotarget **8**(5): 8369-8382.

Dohi, T., E. Beltrami, N. R. Wall, J. Plescia and D. C. Altieri (2004). "Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis." J Clin Invest **114**(8): 1117-1127.

Dohi, T., K. Okada, F. Xia, C. E. Wilford, T. Samuel, K. Welsh, H. Marusawa, H. Zou, R. Armstrong, S. Matsuzawa, G. S. Salvesen, J. C. Reed and D. C. Altieri (2004). "An IAP-IAP complex inhibits apoptosis." J Biol Chem **279**(33): 34087-34090.

Eissa, S., S. Badr, M. Barakat, A. S. Zaghoul and M. Mohanad (2013). "The diagnostic efficacy of urinary survivin and hyaluronidase mRNA as urine markers in patients with bladder cancer." Clin Lab **59**(7-8): 893-900.

Falconi, M., B. Eriksson, G. Kaltsas, D. K. Bartsch, J. Capdevila, M. Caplin, B. Kos-Kudla, D. Kwekkeboom, G. Rindi, G. Kloppel, N. Reed, R. Kianmanesh and R. T. Jensen (2016). "ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Patients with Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors and Non-Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors." Neuroendocrinology **103**(2): 153-171.

Falconi, M., B. Eriksson, G. Kaltsas, D. K. Bartsch, J. Capdevila, M. Caplin, B. Kos-Kudla, D. Kwekkeboom, G. Rindi, G. Kloppel, N. Reed, R. Kianmanesh, R. T. Jensen and p. all other Vienna Consensus Conference (2016). "ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Patients with Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors and Non-Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors." Neuroendocrinology **103**(2): 153-171.

Flanagan, L., J. Kehoe, J. Fay, O. Bacon, A. U. Lindner, E. W. Kay, J. Deasy, D. A. McNamara and J. H. Prehn (2015). "High levels of X-linked Inhibitor-of-Apoptosis Protein (XIAP) are indicative of radio chemotherapy resistance in rectal cancer." Radiat Oncol **10**: 131.

Flygare, J. A., M. Beresini, N. Budha, H. Chan, I. T. Chan, S. Cheeti, F. Cohen, K. Deshayes, K. Doerner, S. G. Eckhardt, L. O. Elliott, B. Feng, M. C. Franklin, S. F. Reisner, L. Gazzard, J. Halladay, S. G. Hymowitz, H. La, P. LoRusso, B. Maurer, L. Murray, E. Plise, C. Quan, J. P. Stephan, S. G. Young, J. Tom, V. Tsui, J. Um, E. Varfolomeev, D. Vucic, A. J. Wagner, H. J. Wallweber, L. Wang, J. Ware, Z. Wen, H. Wong, J. M. Wong, M. Wong, S. Wong, R. Yu, K. Zobel and W. J. Fairbrother (2012). "Discovery of a potent small-molecule antagonist of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins and clinical candidate for the treatment of cancer (GDC-0152)." J Med Chem **55**(9): 4101-4113.

Fulda, S. (2015). "Smac mimetics as IAP antagonists." Semin Cell Dev Biol **39**: 132-138.

Garcia-Carbonero, R., A. Rinke, J. W. Valle, N. Fazio, M. Caplin, V. Gorbounova, O. C. J. B. Eriksson, H. Sorbye, M. Kulke, J. Chen, J. Falkerby, F. Costa, W. de Herder, C. Lombard-Bohas, M. Pavel and p. Antibes Consensus Conference (2017). "ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Neoplasms. Systemic Therapy 2: Chemotherapy." Neuroendocrinology **105**(3): 281-294.

Garcia-Carbonero, R., H. Sorbye, E. Baudin, E. Raymond, B. Wiedenmann, B. Niederle, E. Sedlackova, C. Toumpanakis, M. Anlauf, J. B. Cwikla, M. Caplin, D. O'Toole, A. Perren and p. all other Vienna Consensus Conference (2016). "ENETS Consensus Guidelines for High-Grade Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors and Neuroendocrine Carcinomas." Neuroendocrinology **103**(2): 186-194.

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

Go, Y. H., C. Lim, H. C. Jeong, O. S. Kwon, S. Chung, H. Lee, W. Kim, Y. G. Suh, W. S. Son, M. O. Lee, H. J. Cha and S. H. Kim (2019). "Structure-Activity Relationship Analysis of YM155 for Inducing Selective Cell Death of Human Pluripotent Stem Cells." Front Chem **7**: 298.

Grabowski, P., S. Griss, C. N. Arnold, D. Horsch, R. Goke, R. Arnold, B. Heine, H. Stein, M. Zeitz and H. Scherubl (2005). "Nuclear survivin is a powerful novel prognostic marker in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease." Neuroendocrinology **81**(1): 1-9.

Hassan, M. M., A. Phan, D. Li, C. G. Dagohoy, C. Leary and J. C. Yao (2008). "Risk factors associated with neuroendocrine tumors: A U.S.-based case-control study." Int J Cancer **123**(4): 867-873.

Huang, Y., Y. C. Park, R. L. Rich, D. Segal, D. G. Myszka and H. Wu (2001). "Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain." Cell **104**(5): 781-790.

Hwu, J. R., W. N. Tseng, J. Gnabre, P. Giza and R. C. Huang (1998). "Antiviral activities of methylated nordihydroguaiaretic acids. 1. Synthesis, structure identification, and inhibition of tat-regulated HIV transactivation." J Med Chem **41**(16): 2994-3000.

Janson, E. T., H. Sorbye, S. Welin, B. Federspiel, H. Gronbaek, P. Hellman, O. Mathisen, J. Mortensen, A. Sundin, E. Thiis-Evensen, M. J. Valimaki, K. Oberg and U. Knigge (2010). "Nordic Guidelines 2010 for diagnosis and treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours." Acta Oncol **49**(6): 740-756.

Jeyaprakash, A. A., U. R. Klein, D. Lindner, J. Ebert, E. A. Nigg and E. Conti (2007). "Structure of a Survivin-Borealin-INCENP core complex reveals how chromosomal passengers travel together." Cell **131**(2): 271-285.

Kelly, R. J., A. Thomas, A. Rajan, G. Chun, A. Lopez-Chavez, E. Szabo, S. Spencer, C. A. Carter, U. Guha, S. Khozin, S. Poondru, C. Van Sant, A. Keating, S. M. Steinberg, W. Figg and G. Giaccone (2013). "A phase I/II study of sepantronium bromide (YM155, survivin suppressor) with paclitaxel and carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer." Ann Oncol **24**(10): 2601-2606.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.

Knauer, S. K., W. Mann and R. H. Stauber (2007). "Survivin's dual role: an export's view." Cell Cycle **6**(5): 518-521.

Krepler, C., S. K. Chunduru, M. B. Halloran, X. He, M. Xiao, A. Vultur, J. Villanueva, Y. Mitsuuchi, E. M. Neiman, C. Benetatos, K. L. Nathanson, R. K. Amaravadi, H. Pehamberger, M. McKinlay and M. Herlyn (2013). "The novel SMAC mimetic birinapant exhibits potent activity against human melanoma cells." Clin Cancer Res **19**(7): 1784-1794.

Krieg, A., S. Mersch, I. Boeck, L. Dizdar, E. Weihe, Z. Hilal, M. Krausch, B. Mohlendick, S. A. Topp, R. P. Piekorz, W. Huckenbeck, N. H. Stoecklein, M. Anlauf and W. T. Knoefel (2014). "New model for gastroenteropancreatic large-cell neuroendocrine carcinoma: establishment of two clinically relevant cell lines." PLoS One **9**(2): e88713.

Latt, S. A., G. Stetten, L. A. Juergens, H. F. Willard and C. D. Scher (1975). "Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence." J Histochem Cytochem **23**(7): 493-505.

Lehnert, T. K., HP (1997). "Diagnostik und Therapie von Lebermetastasen neuroendokriner Tumoren." Der Chirurg.

Lens, S. M., G. Vader and R. H. Medema (2006). "The case for Survivin as mitotic regulator." Curr Opin Cell Biol **18**(6): 616-622.

Li, X., X. Ma, X. Lu, L. Cui and W. Dong (2007). "[Expression of inhibitor of apoptosis protein XIAP in laryngeal carcinoma and its clinicopathological significance]." Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi **21**(21): 973-975.

Lin, S. C., Y. Huang, Y. C. Lo, M. Lu and H. Wu (2007). "Crystal structure of the BIR1 domain of XIAP in two crystal forms." J Mol Biol **372**(4): 847-854.

Liston, P., N. Roy, K. Tamai, C. Lefebvre, S. Baird, G. Cherton-Horvat, R. Farahani, M. McLean, J. E. Ikeda, A. MacKenzie and R. G. Korneluk (1996). "Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes." Nature **379**(6563): 349-353.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.

Lladser, A., C. Sanhueza, R. Kiessling and A. F. Quest (2011). "Is survivin the potential Achilles' heel of cancer?" Adv Cancer Res **111**: 1-37.

Lu, M., S. C. Lin, Y. Huang, Y. J. Kang, R. Rich, Y. C. Lo, D. Myszka, J. Han and H. Wu (2007). "XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization." Mol Cell **26**(5): 689-702.

Maas, C., J. M. Tromp, J. van Laar, R. Thijssen, J. A. Elias, A. Malara, A. Krippner-Heidenreich, J. Silke, M. H. van Oers and E. Eldering (2013). "CLL cells are resistant to smac mimetics because of an inability to form a ripoptosome complex." Cell Death Dis **4**: e782.

Mantel, N. (1966). "Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration." Cancer Chemother Rep **50**(3): 163-170.

Martinez-Garcia, D., N. Manero-Ruperez, R. Quesada, L. Korrodi-Gregorio and V. Soto-Cerrato (2019). "Therapeutic strategies involving survivin inhibition in cancer." Med Res Rev **39**(3): 887-909.

Marusawa, H., S. Matsuzawa, K. Welsh, H. Zou, R. Armstrong, I. Tamm and J. C. Reed (2003). "HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression." EMBO J **22**(11): 2729-2740.

Mehrotra, S., L. R. Languino, C. M. Raskett, A. M. Mercurio, T. Dohi and D. C. Altieri (2010). "IAP regulation of metastasis." Cancer Cell **17**(1): 53-64.

Melegari, M., P. P. Scaglioni and J. R. Wands (1998). "Cloning and characterization of a novel hepatitis B virus x binding protein that inhibits viral replication." J Virol **72**(3): 1737-1743.

Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.

Nakahara, T., A. Kita, K. Yamanaka, M. Mori, N. Amino, M. Takeuchi, F. Tominaga, S. Hatakeyama, I. Kinoyama, A. Matsuhisa, M. Kudoh and M. Sasamata (2007). "YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts." Cancer Res **67**(17): 8014-8021.

Niederle, B., U. F. Pape, F. Costa, D. Gross, F. Kelestimur, U. Knigge, K. Oberg, M. Pavel, A. Perren, C. Toumpanakis, J. O'Connor, D. O'Toole, E. Krenning, N. Reed, R. Kianmanesh and p. all other Vienna Consensus Conference (2016). "ENETS Consensus Guidelines Update for Neuroendocrine Neoplasms of the Jejunum and Ileum." Neuroendocrinology **103**(2): 125-138.

Niederle, M. B., M. Hackl, K. Kaserer and B. Niederle (2010). "Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: the current incidence and staging based on the WHO and European Neuroendocrine Tumour Society classification: an analysis based on prospectively collected parameters." Endocr Relat Cancer **17**(4): 909-918.

Ookura, M., T. Fujii, H. Yagi, T. Ogawa, S. Kishi, N. Hosono, H. Shigemi, T. Yamauchi, T. Ueda and A. Yoshida (2017). "YM155 exerts potent cytotoxic activity against quiescent (G0/G1) multiple myeloma and bortezomib resistant cells via inhibition of survivin and Mcl-1." Oncotarget **8**(67): 111535-111550.

Owens, T. W., F. M. Foster, A. Valentijn, A. P. Gilmore and C. H. Streuli (2010). "Role for X-linked Inhibitor of apoptosis protein upstream of mitochondrial permeabilization." J Biol Chem **285**(2): 1081-1088.

Papadopoulos, K. P., J. Lopez-Jimenez, S. E. Smith, J. Steinberg, A. Keating, C. Sasse, F. Jie and A. Thyss (2016). "A multicenter phase II study of sepantronium bromide (YM155) plus rituximab in patients with relapsed aggressive B-cell Non-Hodgkin lymphoma." Leuk Lymphoma **57**(8): 1848-1855.

Pape, U. F., U. Berndt, J. Muller-Nordhorn, M. Bohmig, S. Roll, M. Koch, S. N. Willich and B. Wiedenmann (2008). "Prognostic factors of long-term outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours." Endocr Relat Cancer **15**(4): 1083-1097.

Pape, U. F., B. Niederle, F. Costa, D. Gross, F. Kelestimur, R. Kianmanesh, U. Knigge, K. Oberg, M. Pavel, A. Perren, C. Toumpanakis, J. O'Connor, E. Krenning, N. Reed, D. O'Toole and p. all other Vienna Consensus Conference (2016). "ENETS Consensus Guidelines for Neuroendocrine Neoplasms of the Appendix (Excluding Goblet Cell Carcinomas)." Neuroendocrinology **103**(2): 144-152.

Pavel, M., D. O'Toole, F. Costa, J. Capdevila, D. Gross, R. Kianmanesh, E. Krenning, U. Knigge, R. Salazar, U. F. Pape, K. Oberg and p. all other Vienna Consensus Conference (2016). "ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Distant Metastatic Disease of Intestinal, Pancreatic, Bronchial Neuroendocrine Neoplasms (NEN) and NEN of Unknown Primary Site." Neuroendocrinology **103**(2): 172-185.

Pavlyukov, M. S., N. V. Antipova, M. V. Balashova, T. V. Vinogradova, E. P. Kopantzev and M. I. Shakhparonov (2011). "Survivin monomer plays an essential role in apoptosis regulation." J Biol Chem **286**(26): 23296-23307.

Perren, A., A. Couvelard, J. Y. Scoazec, F. Costa, I. Borbath, G. Delle Fave, V. Gorbounova, D. Gross, A. Grossma, R. T. Jense, M. Kulke, K. Oeberg, G. Rindi, H. Sorbye, S. Welin and p. Antibes Consensus Conference (2017). "ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Pathology: Diagnosis and Prognostic Stratification." Neuroendocrinology **105**(3): 196-200.

Petersen, S. L., M. Peyton, J. D. Minna and X. Wang (2010). "Overcoming cancer cell resistance to Smac mimetic induced apoptosis by modulating cIAP-2 expression." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(26): 11936-11941.

Potts, M. B., A. E. Vaughn, H. McDonough, C. Patterson and M. Deshmukh (2005). "Reduced Apaf-1 levels in cardiomyocytes engage strict regulation of apoptosis by endogenous XIAP." J Cell Biol **171**(6): 925-930.

Ramage, J. K., W. W. De Herder, G. Delle Fave, P. Ferolla, D. Ferone, T. Ito, P. Ruzniewski, A. Sundin, W. Weber, Z. Zheng-Pei, B. Taal, A. Pascher and p. all other

Vienna Consensus Conference (2016). "ENETS Consensus Guidelines Update for Colorectal Neuroendocrine Neoplasms." Neuroendocrinology **103**(2): 139-143.

Remmele, W. and H. E. Stegner (1987). "[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]." Pathologie **8**(3): 138-140.

Rinke A., A. R. (2014). "Aktuelle Therapie neuroendokriner Tumoren." Arzneimitteltherapie **2014, 32:2-13**: 2-13.

Satoh, T., I. Okamoto, M. Miyazaki, R. Morinaga, A. Tsuya, Y. Hasegawa, M. Terashima, S. Ueda, M. Fukuoka, Y. Ariyoshi, T. Saito, N. Masuda, H. Watanabe, T. Taguchi, T. Kakihara, Y. Aoyama, Y. Hashimoto and K. Nakagawa (2009). "Phase I study of YM155, a novel survivin suppressant, in patients with advanced solid tumors." Clin Cancer Res **15**(11): 3872-3880.

Schott, M., G. Kloppel, A. Raffel, A. Saleh, W. T. Knoefel and W. A. Scherbaum (2011). "Neuroendocrine neoplasms of the gastrointestinal tract." Dtsch Arztebl Int **108**(18): 305-312.

Seligson, D. B., F. Hongo, S. Huerta-Yepez, Y. Mizutani, T. Miki, H. Yu, S. Horvath, D. Chia, L. Goodglick and B. Bonavida (2007). "Expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein is a strong predictor of human prostate cancer recurrence." Clin Cancer Res **13**(20): 6056-6063.

Shah, M. H., W. S. Goldner, T. R. Halfdanarson, E. Bergsland, J. D. Berlin, D. Halperin, J. Chan, M. H. Kulke, A. B. Benson, 3rd, L. S. Blazzkowsky, J. Eads, P. F. Engstrom, P. Fanta, T. Giordano, J. He, M. J. Heslin, G. P. Kalemkerian, F. Kandeel, S. A. Khan, W. Z. Kidwai, P. L. Kunz, B. W. Kuvshinoff, 2nd, C. Lieu, V. G. Pillarisetty, L. Saltz, J. A. Sosa, J. R. Strosberg, C. A. Sussman, N. A. Trikalinos, N. A. Uboha, J. Whisenant, T. Wong, J. C. Yao, J. L. Burns, N. Ogba and G. Zuccarino-Catania (2018). "NCCN Guidelines Insights: Neuroendocrine and Adrenal Tumors, Version 2.2018." J Natl Compr Canc Netw **16**(6): 693-702.

Simbulan-Rosenthal, C. M., D. S. Rosenthal, S. Iyer, A. H. Boulares and M. E. Smulson (1998). "Transient poly(ADP-ribosyl)ation of nuclear proteins and role of poly(ADP-ribose) polymerase in the early stages of apoptosis." J Biol Chem **273**(22): 13703-13712.

Singh, S., L. Moody, D. L. Chan, D. C. Metz, J. Strosberg, T. Asmis, D. L. Bailey, E. Bergsland, K. Brendtro, R. Carroll, S. Cleary, M. Kim, G. Kong, C. Law, B. Lawrence, A. McEwan, C. McGregor, M. Michael, J. Pasiaka, N. Pavlakis, R. Pommier, M. Soulen, D. Wyld, E. Segelov and G. Commonwealth Neuroendocrine Tumour Collaboration Follow-up Working (2018). "Follow-up Recommendations for Completely Resected Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors." JAMA Oncol **4**(11): 1597-1604.

- Song, Z., X. Yao and M. Wu (2003). "Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis." *J Biol Chem* **278**(25): 23130-23140.
- Sorbye, H., J. Strosberg, E. Baudin, D. S. Klimstra and J. C. Yao (2014). "Gastroenteropancreatic high-grade neuroendocrine carcinoma." *Cancer* **120**(18): 2814-2823.
- Sorbye, H., S. Welin, S. W. Langer, L. W. Vestermark, N. Holt, P. Osterlund, S. Dueland, E. Hofslie, M. G. Guren, K. Ohrling, E. Birkemeyer, E. Thiis-Evensen, M. Biagini, H. Gronbaek, L. M. Soveri, I. H. Olsen, B. Federspiel, J. Assmus, E. T. Janson and U. Knigge (2013). "Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study." *Ann Oncol* **24**(1): 152-160.
- Stauber, R. H., W. Mann and S. K. Knauer (2007). "Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential." *Cancer Res* **67**(13): 5999-6002.
- Strosberg, J. R., T. R. Halfdanarson, A. M. Bellizzi, J. A. Chan, J. S. Dillon, A. P. Heaney, P. L. Kunz, T. M. O'Dorisio, R. Salem, E. Segelov, J. R. Howe, R. F. Pommier, K. Brendtro, M. A. Bashir, S. Singh, M. C. Soulen, L. Tang, J. S. Zacks, J. C. Yao and E. K. Bergsland (2017). "The North American Neuroendocrine Tumor Society Consensus Guidelines for Surveillance and Medical Management of Midgut Neuroendocrine Tumors." *Pancreas* **46**(6): 707-714.
- Tamm, I., S. M. Kornblau, H. Segall, S. Krajewski, K. Welsh, S. Kitada, D. A. Scudiero, G. Tudor, Y. H. Qui, A. Monks, M. Andreeff and J. C. Reed (2000). "Expression and prognostic significance of IAP-family genes in human cancers and myeloid leukemias." *Clin Cancer Res* **6**(5): 1796-1803.
- Thomas A. Kufer, J. H. F., Dana J. Philpott (2005). "NACHT-LRR proteins (NLRs) in bacterial infection and immunity." *Trends in Microbiology* **Volume 13**(Issue 8): 381-388.
- Tolcher, A. W., A. Mita, L. D. Lewis, C. R. Garrett, E. Till, A. I. Daud, A. Patnaik, K. Papadopoulos, C. Takimoto, P. Bartels, A. Keating and S. Antonia (2008). "Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin." *J Clin Oncol* **26**(32): 5198-5203.
- Tonnies, H., M. R. Toliat, C. Ramel, U. F. Pape, H. Neitzel, W. Berger and B. Wiedenmann (2001). "Analysis of sporadic neuroendocrine tumours of the enteropancreatic system by comparative genomic hybridisation." *Gut* **48**(4): 536-541.
- Vandghanooni, S., M. Eskandani, V. Montazeri, M. Halimi, E. Babaei and M. A. Feizi (2011). "Survivin-deltaEx3: a novel biomarker for diagnosis of papillary thyroid carcinoma." *J Cancer Res Ther* **7**(3): 325-330.

Vaughn, A. E. and M. Deshmukh (2007). "Essential postmitochondrial function of p53 uncovered in DNA damage-induced apoptosis in neurons." Cell Death Differ **14**(5): 973-981.

Verdecia, M. A., H. Huang, E. Dutil, D. A. Kaiser, T. Hunter and J. P. Noel (2000). "Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement." Nat Struct Biol **7**(7): 602-608.

Welsch, U. K. W. D., Thomas (2018). Histologie- Das Lehrbuch, Elsevier.

Werner, T. A., I. Nolten, L. Dizdar, J. C. Riemer, S. C. Schutte, P. E. Verde, K. Raba, M. Schott, W. T. Knoefel and A. Krieg (2018). "IAPs cause resistance to TRAIL-dependent apoptosis in follicular thyroid cancer." Endocr Relat Cancer **25**(3): 295-308.

Werner, T. A., Y. Tamkan-Olcek, L. Dizdar, J. C. Riemer, A. Wolf, K. Cupisti, P. E. Verde, W. T. Knoefel and A. Krieg (2016). "Survivin and XIAP: two valuable biomarkers in medullary thyroid carcinoma." Br J Cancer **114**(4): 427-434.

Wheatley, S. P. and D. C. Altieri (2019). "Survivin at a glance." J Cell Sci **132**(7).

Whitney, H. B. M. D. R. (1947). "On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other." The Annals of Mathematical Statistics **Volume 18**(Number 1): 50-60.

Yan, Y., C. Mahotka, S. Heikaus, T. Shibata, N. Wethkamp, J. Liebmann, C. V. Suschek, Y. Guo, H. E. Gabbert, C. D. Gerharz and U. Ramp (2004). "Disturbed balance of expression between XIAP and Smac/DIABLO during tumour progression in renal cell carcinomas." Br J Cancer **91**(7): 1349-1357.

Zhou, H., M. Q. Du and V. M. Dixit (2005). "Constitutive NF-kappaB activation by the t(11;18)(q21;q21) product in MALT lymphoma is linked to deregulated ubiquitin ligase activity." Cancer Cell **7**(5): 425-431.

Zhu, H., Y. Li, Y. Liu and B. Han (2019). "Bivalent SMAC Mimetics for Treating Cancer by Antagonizing Inhibitor of Apoptosis Proteins." ChemMedChem.

Zou, H., R. Yang, J. Hao, J. Wang, C. Sun, S. W. Fesik, J. C. Wu, K. J. Tomaselli and R. C. Armstrong (2003). "Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP." J Biol Chem **278**(10): 8091-8098.

7. 2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der IAPs, modifiziert nach Eckelman et Al. (2006) Abkürzungen: BIRC 1-8: Baculovirus Inhibitor of Apoptosis Protein Repeat Containing 1-8; NAIP: Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein; cIAP1 und 2: Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1 und 2; HIAP 1 und 2: Human Inhibitor of Apoptosis Protein 1 und 2, MIHA, MIHB, MIHC: Mammalian Inhibitor of Apoptosis Protein Homolog A, B, C; XIAP: X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein; ILP 1 und 2: Inhibitor if Apoptosis like Protein 1 und 2; ML-IAP: Melanoma Inhibitor of Apoptosis Protein; KIAP: Kidney Inhibitor of Apoptosis Protein; Ts-IAP: Testis specific Inhibitor of Apoptosis Protein; NACHT: Domäne, die in <u>NAIP</u> , <u>CIITA</u> (major histocompatibility complex class II activator), <u>HET-E</u> (Genprodukt des HET-Gens in Pflanzen), <u>TP1</u> (Telomerase-Associated Protein 1) vorkommt; RING: Really interesting new Gene, LRR: Leucin rich repeat, CARD: Caspase Recruitment Domain, UBC: Ubiquitin conjugating	8
Abbildung 2: Schematische, vereinfachte Darstellung der Vorgänge in der Zelle beim intrinsischen und extrinsischen Weg der Apoptose. Survivin und XIAP bilden mit HBXIP einen Komplex, der die Caspasen hemmt. Survivin wirkt zusätzlich im Zellkern durch Interaktion mit dem CPC. (Abkürzungen: SMAC: second mitochondria-derived activator of caspase, HBXIP: Hepatitis B Virus Interacting Protein, CPC: chromosomal passenger complex, XIAP: X-linked inhibitor of Apoptosis Protein, FADD: fas associated death domain containing protein, DNA: desoxyribonuclein acid).....	11
Abbildung 3: Chemische Struktur M4N, YM155.....	13
Abbildung 4: Schematischer Aufbau TMA-Block.....	36
Abbildung 5: Foto des <i>Manual Tissue Arrayer</i> MTA-1 (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA).....	36
Abbildung 6: Expression von XIAP, Survivin, Ki-67 (Grading) in einem niedrig malignen G1-Tumor (erste Spalte), einem mittelgradigem G2-Tumor (mittlere Spalte) sowie einem hochmalignen G3 Tumor (letzte Spalte. Aufgenommen mittels Leica Application Suite. Vergrößerung 400-fach, Massstab 10 µm (Dizdar, Oesterwind et al. 2017).....	43

Abbildung 7: Kaplan Meier Analyse: Nukleäre Survivin (SVV) - Expression. Die Kaplan Meier Kurven wurden mittels Cox-Regressionsanalyse erstellt. Darstellung als Hazard-Ratio mit 95% Konfidenzintervall.....	49
Abbildung 8: Kaplan Meier Analyse: Zytoplasmatische Survivin (SVV) - Expression. Die Kaplan Meier Kurven wurden mittels Cox-Regressionsanalyse erstellt. Darstellung als Hazard-Ratio mit 95% Konfidenzintervall.....	49
Abbildung 9: Kaplan Meier Analyse: XIAP- Expression (nur zytoplasmatisch). Die Kaplan Meier Kurven wurden mittels Cox-Regressionsanalyse erstellt. Darstellung als Hazard-Ratio mit 95% Konfidenzintervall.....	50
Abbildung 10: Protein-Expression der IAPs Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in GEP-NEC-Zelllinien; Ladekontrollen im Westernblot: Tubulin für Survivin, GAPDH für XIAP B: mRNA Expression der IAPs Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in der NEC-DUE1 Zelllinie C: mRNA Expression der IAPs Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in der NEC-DUE2 Zelllinie MW = <i>molecular weight</i> , kDA = kiloDalton, <i>Fold change to reference</i> : Änderung im Vgl. zur Kontrolle.....	54
Abbildung 11: Immunfluoreszenzfärbung NEC-DUE1 mit Survivin und Hoechst-Kernfärbung sowie Überlagerung („ <i>Merge</i> “) beider Bilder zur besseren Darstellung der Lokalisation von Survivin in den Zellen, aufgenommen mit Leica Application Suite...	55
Abbildung 12: Immunfluoreszenzfärbung NEC-DUE2 mit Survivin und Hoechst-Kernfärbung sowie Überlagerung („ <i>Merge</i> “) beider Bilder zur besseren Darstellung der Lokalisation von Survivin in den Zellen, aufgenommen mit Leica Application Suite...	55
Abbildung 13: Proteinexpression von Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in der Zelllinie NEC-DUE1 nach Behandlung mit YM155 in steigender Konzentration (10, 30, 100, 300 nM, aufsteigend von links nach rechts). Ladekontrolle: Tubulin, GAPDH. Inkubationszeit: 24 Stunden.....	57
Abbildung 14: Proteinexpression von Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in der Zelllinie NEC-DUE1 nach Behandlung mit M4N in steigender Konzentration (0.3 µM,	

1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , aufsteigend von links nach rechts). Ladekontrolle: Tubulin, GAPDH. Inkubationszeit: 24 Stunden.....	57
Abbildung 15: Proteinexpression von Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in der Zelllinie NEC-DUE2 nach Behandlung mit YM155 in steigender Konzentration (10, 30, 100, 300 nM, aufsteigend von links nach rechts). Ladekontrolle: Tubulin, GAPDH. Inkubationszeit: 24 Stunden.....	58
Abbildung 16: Proteinexpression von Survivin, XIAP, cIAP1 und cIAP2 in der Zelllinie NEC-DUE2 nach Behandlung mit M4N in steigender Konzentration (0.3 μM , 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , aufsteigend von links nach rechts). Ladekontrolle: Tubulin, GAPDH. Inkubationszeit: 24 Stunden.....	58
Abbildung 17: Expression von PARP und seinem Spaltprodukt („ <i>Cleaved PARP</i> “) in NEC-DUE1 und NEC-DUE2-Zellen nach Behandlung mit YM155 in steigender Konzentration sowie DMSO als Kontrolle: Nachweis einer PARP-Spaltung für NEC- DUE2. Tubulin diente als Ladekontrolle. Inkubationszeit mit YM155 und DMSO: 48 Stunden.....	59
Abbildung 18: Abnahme der Zellviabilität nach Behandlung mit YM155 für 48 und 96 Stunden im MTS-Assay und Darstellung der mittleren inhibitorischen Konzentration für NEC-DUE1 und NEC-DUE2.....	60
Abbildung 19: Abnahme der Zellviabilität nach Behandlung mit M4N für 48 und 96 Stunden im MTS-Assay und Darstellung der mittleren inhibitorischen Konzentration für NEC-DUE1 und NEC-DUE2.....	60
Abbildung 20: Abnahme der Proliferation der Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 nach 48 und 96 stündiger Inkubation im BrdU-Assay nach Behandlung mit YM155 und M4N.....	61
Abbildung 21: Caspase-3/7-Aktivität in NEC-DUE Zelllinien nach Behandlung mit YM155 in aufsteigenden Konzentrationen nach zwei Stunden Inkubationszeit. Signifikanzniveau angegeben mit Sternchen: * = $p \leq 0.05$, ** = $p \leq 0.01$. Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-Test.....	62

Abbildung 22: Caspase-3/7-Aktivität in NEC-DUE Zelllinien nach Behandlung mit M4N nach zwei und sechs Stunden Inkubationszeit: Keine Änderung der Caspase-Aktivität.....	62
Abbildung 23: Viabilität der Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 im MTS-Assay nach Behandlung mit GDC-0152, Inkubationszeit 48 Stunden.....	63
Abbildung 24: Viabilität der Zelllinien NEC-DUE1 und NEC-DUE2 im MTS-Assay nach Behandlung mit Birinapant, Inkubationszeit 48 Stunden.....	63

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO Klassifikation, modifiziert nach Capelli et al, 2013.....	2
Tabelle 2: Übersicht neuroendokrine Tumore, modifiziert nach Rinke et al.	3
Tabelle 3: Auflistung der Geräte	18
Tabelle 4: Auflistung Reagenzien, Hersteller	19
Tabelle 5: Verwendete Lösungen und Puffer und ihre Zusammensetzung	20
Tabelle 6: NEC-DUE Zelllinien: Herkunft, TNM, Status	21
Tabelle 7: Primärantikörper Western Blot	26
Tabelle 8: Sekundärantikörper Western Blot	26
Tabelle 9: Antikörper Immunfluoreszenz	31
Tabelle 10: Primer und Sonden RealTime PCR	33
Tabelle 11: Antikörper Immunhistochemie	38
Tabelle 12: Auswertung der immunhistochemischen Färbung anhand folgender Tabelle (modifiziert nach Remmele und Stegner)	39
Tabelle 13: Patientenkollektiv wie für die Auswertung der Daten verwendet: n= 77 nach Aussortieren der Patientenproben, bei denen keine Proben des Primärtumors (nur Metastasengewebe) vorlag. Aufgeschlüsselt nach Alter, Geschlecht, Tumorstadium...41	41
Tabelle 14: Korrelation der nukleären Survivin-Expression mit klinisch pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Tumorstadium nach TNM sowie Lokalisation	46
Tabelle 15: Korrelation der zytoplasmatischen Expression von Survivin mit klinisch pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Tumorstadium nach TNM sowie Lokalisation.....	47
Tabelle 16: Korrelation der Expression von XIAP mit klinisch pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Tumorstadium nach TNM sowie Lokalisation, XIAP wird nur zytoplasmatisch exprimiert, daher keine Aufschlüsselung nach Expressionsort möglich.....	48

Tabelle 17: Univariate Analyse des Zusammenhanges von klinisch pathologischen Variablen sowie der IAP Expression (Survivin und XIAP) mit dem Gesamtüberleben von Patientin mit GEP-NEN.....51

Tabelle 18: Multivariate Analyse des Zusammenhanges von klinisch pathologischen Variablen sowie der IAP Expression (Survivin und XIAP) mit dem Gesamtüberleben von Patientin mit GEP-NEN.....52

Danksagung

Ein erster Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. Andreas Krieg sowie an Herrn Prof. Wolfram Trudo Knoefel für die Ermöglichung des Erstellens der Dissertation in Ihrer Klinik.

Herzlichen Dank Herrn Prof. Dr. med. Andreas Krieg für die große Hilfe und Geduld bei der Korrektur der Arbeit.

Ein besonderer herzlicher Dank gilt meinen Betreuer Herrn PD Dr. med. Levent Dizdar. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen und ich bin sehr dankbar für die stets gute Betreuung. Danke für deine Geduld und Ausdauer und die gute Unterstützung.

Gleiches gilt für Frau Dr. rer. nat. Sabrina Mersch. Ich danke dir ganz herzlich für deine hervorragende Betreuung im Labor, ein stets offenes Ohr und helfende Hände.

Danke auch an das gesamte Team des chirurgischen Forschungslabors, besonders zu erwähnen hier die Leitung Frau Imke Hoffmann sowie Herrn Prof. Niklaus Stoecklein. Ihr seid ein wunderbares Team gewesen, ohne dass ich diese Arbeit so nicht hätte fertigstellen können.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau Dr. med. Zena Hilal bedanken, die mir während der Arbeit im Institut für Pathologie stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich danke der deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanziellen Mittel, ohne die diese Arbeit nicht realisierbar gewesen wäre.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie für die stete Unterstützung während des gesamten Studiums und der Assistenzarztzeit und meinem Freund Dwight für viel Geduld und Verständnis.