

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

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

Untersuchung der Expression der Histon-Deacetylase (HDAC) 5 und 9
in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NEN)
mit Hilfe von Tissue Microarrays (TMAs) in einer
immunhistochemischen Färbung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jung Hoon Koh

2024

Angabe der Gutachter

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

gez.:

Dekan/in: Univ. Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Andreas Krieg

Zweitgutachter/in: Univ.-Prof. Dr. med. Christoph Roderburg

Für die Eltern

Shin Hyun Koh, Eun Ran Ju

Se Hee Lee, In Ho Hong

Für Hyun Jung Lee, meine Frau

Zusammenfassung

Gastroenteropankreatische neuroendokrine Karzinome (GEP-NEC) gelten als der biologisch aggressivste Subtyp der gastrointestinalen neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NEN). Sie zeichnen sich durch schnelles Tumorwachstum, frühe Metastasierung und hohe Resistenz gegenüber herkömmlichen Chemotherapien aus. Die Tumorbilogie und die klinischen Behandlungsdaten dieser seltenen Malignome sind trotz weltweit steigender Prävalenz und Inzidenz noch unzureichend erforscht. Die äußerst ungünstige Prognose von GEP-NECs unterstreicht die Dringlichkeit eines besseren biologischen Verständnisses und innovativer Therapieansätze für diese Erkrankung.

Histondeacetylasen (HDACs) sind pleiotrope epigenetische Regulatoren, deren Fehlfunktion eine wichtige Rolle bei der Entstehung verschiedener maligner Erkrankungen spielt. Sie sind daher ein vielversprechender neuer therapeutischer Angriffspunkt für die Tumorthherapie. Während mehrere HDAC-Inhibitoren (HDACis) bereits in klinischen Studien getestet wurden, ist die Wirkung von HDACis auf GEP-NEN noch nicht ausreichend untersucht. Ziel dieser Dissertation war es, die Relevanz von HDAC5 und -9 als mögliche prognostische Marker und Targets für die Entwicklung von therapeutischen Ansätzen bei Patienten mit GEP-NEN zu untersuchen.

Die Expression von HDAC5 und -9 wurde in verschiedenen Tumorkompartimenten von 78 Patienten immunhistochemisch auf Tissue Microarrays analysiert und mittels eines immunreaktiven Scores quantifiziert. Für HDAC5 und -9 wurde eine Differenzierung zwischen nukleären und zytoplasmatischen HDACs vorgenommen. Anschließend wurde die Expression mit klinisch-pathologischen Parametern und Überlebensdaten der Patienten korreliert.

Die Ergebnisse zeigten eine Überexpression von zytoplasmatischem HDAC5 und nukleärem HDAC9 in GEP-NEN Gewebeproben im Vergleich zu Normalgewebe. Die Analyse mit klinisch-pathologischen Parametern erbrachte eine signifikante Assoziation von sowohl nukleärem als auch zytoplasmatischem HDAC9 mit dem proliferationsbasierten Tumorgrading, wobei die höchste Expression von HDAC9 in schlecht differenzierten GEP-NEN (G3) auftrat. Die Expression beider HDACs in allen untersuchten Gewebeproben wurde in die Überlebensanalyse einbezogen. Die signifikanteste Korrelation bestand zwischen der Expression von HDAC9 und dem

Überleben. In der univariaten Analyse korrelierten die Expressionsstärke von nukleärem HDAC9, das Patientenalter, der Lymphknotenstatus, das Grading und die Tumorlokalisation mit einem ungünstigen Überleben. Die Expressionsstärke von nukleärem HDAC9, das Alter der Patienten und der Lymphknotenstatus konnten in der multivariaten Überlebenszeitanalyse als unabhängige Prognosefaktoren für das kumulative Überleben der Patienten identifiziert werden.

Die Ergebnisse unserer Studie weisen auf eine mögliche Beteiligung von HDAC9 an der Onkogenese von GEP-NEN hin. Die Hochregulation von HDAC9 ist signifikant mit Eigenschaften der Tumorzellproliferation und dem klinischen Outcome assoziiert. Die molekularbiologische Funktion der HDACs, insbesondere von HDAC9, ist noch nicht im Detail untersucht und bleibt unklar. In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass HDAC9 ein signifikanter Prädiktor für ein ungünstiges Überleben bei GEP-NEN ist, was es zu einem interessanten Prognosefaktor macht und als Bestandteil einer multimodalen Therapie weitere detaillierte Untersuchungen rechtfertigt.

Abstract

Gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinomas (GEP-NEC) are considered the most biologically aggressive subtype of gastrointestinal neuroendocrine neoplasms (GEP-NEN). They are characterized by rapid tumor growth, early metastasis and high resistance to conventional chemotherapy. The tumor biology and clinical treatment data of these rare malignancies are still insufficiently researched despite increasing prevalence and incidence worldwide. The extremely poor prognosis of GEP-NECs underscores the urgency of better biological understanding and innovative therapeutic approaches for this disease.

Histone deacetylases (HDACs) are pleiotropic epigenetic regulators whose dysfunction plays an important role in the development of various malignancies. They are therefore a promising new therapeutic target for cancer therapy. While several HDAC inhibitors (HDACis) have already been tested in clinical trials, the effect of HDACis on GEP-NENs has not yet been sufficiently investigated. The aim of this dissertation was to investigate the relevance of HDAC5 and -9 as potential prognostic markers and targets for the development of therapeutic approaches in patients with GEP-NENs.

The expression of HDAC5 and -9 was analyzed immunohistochemically on tissue microarrays in different tumor compartments of 78 patients and quantified using an immunoreactive score. For HDAC5 and -9, a differentiation was made between nuclear and cytoplasmic HDACs. The expression was then correlated with clinicopathological parameters and patient survival data. Subsequently, the expression was correlated with clinicopathological parameters and survival data of the patients.

The expression of HDAC5 and -9 was analyzed immunohistochemically on tissue microarrays in different tumor compartments of 78 patients and quantified using an immunoreactive score. For HDAC5 and -9, a differentiation was made between nuclear and cytoplasmic HDACs. The expression was then correlated with clinicopathological parameters and patient survival data. Subsequently, the expression was correlated with clinicopathological parameters and survival data of the patients.

The results showed overexpression of cytoplasmic HDAC5 and nuclear HDAC9 in GEP-NEN tissue samples compared to normal tissue. Analysis with clinicopathological parameters showed a significant association of both nuclear and cytoplasmic HDAC9

with proliferation-based tumor grading, with the highest expression of HDAC9 occurring in poorly differentiated GEP-NENs (G3). The expression of both HDACs in all tissue samples examined was included in the survival analysis. The most significant correlation was between HDAC9 expression and survival. In the univariate analysis, the expression level of nuclear HDAC9, patient age, lymph node status, grading and tumor location correlated with unfavorable survival. The expression level of nuclear HDAC9, the age of the patients and the lymph node status were identified in the multivariate survival analysis as independent prognostic factors for the cumulative survival of the patients. The results of our study suggest a possible involvement of HDAC9 in the oncogenesis of GEP-NENs. Upregulation of HDAC9 is significantly associated with tumor cell proliferation characteristics and clinical outcome. The molecular biological function of HDACs, especially HDAC9, has not yet been studied in detail and remains unclear. In our study, HDAC9 was shown to be a significant predictor of poor survival in GEP-NEN, making it an interesting prognostic factor and warranting further detailed investigation as part of multimodal therapy.

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ATRX	ATP-abhängige Helikase
BC	Brustkrebs
BCa	Blasenkrebs
CAG	chronisch atrophischer Typ-A-Gastritis
CGA	Chromogranin A
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CSS	krebsspezifisches Überleben
CT	Computertomographie
DAXX	Death-associated Protein 6
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DC	Dendritische Zelle
DM	Fernmetastase
DOTA-TATE	DOTA-0-Tyr3-Octreotat
G	Grading
Ga	Gallium
GBM	Glioblastom
GEP-NEC	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Karzinom
GEP-NEN	Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasie
GEP-Zelle	Gastroenteropankreatische Zelle
ED	Erstdiagnose
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
HAT	Histonacetyltransferase

HCC	Heptozelluläres Karzinom
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitoren
HDAC5	Histondeacetylase5
HDAC9	Histondeacetylase 9
HR	Hazard Ratio
IGFR	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor Rezeptor
IRS	Immunreaktiver Score
Ki-67	Kiel-Antigen Nr.67
LITT	Laserinduzierte Thermotheapie
M	Metastase
MANEC	Gemischtes adenoneuroendcrines Karzinom
MB	Medulloblastom
MEN I	Multiple endokrine Neoplasie Typ I
MICE	Multivariate Imputation durch verkette Geleichung
MiNEN	Gemischte neuroendokrine – nicht-neuroendokrine Neoplasien
MRT	Magnetresonanztomographie
MS-275	Entinostat
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
N	Nodus/Nodal
NaB	Natriumbutytrat
No	Normalgewebe
NEN	Neuroendokrine Neoplasie
NET	Neuroendokrine Tumore
NETest	Neuroendokriner Neoplasmentest
NEC	Neuroendokrines Karzinom

NF-1	Neurofibromatose Typ 1
NSCLC	Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs
panHDACi	Panselektiver HDAC-Inhibitor
PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas
pNETs	Pankreatische neuroendokrine Tumoren
pNEN	Pankreatische neuroendokrine Neoplasie
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PP	Percentage points
PPI	Protonenpumpeninhibitor
PRRT	Peptid Rezeptor-Radionuklidtherapie
PT	Primärtumor
R	Resektionsrand/-status
RB1	Retinoblastom-Protein 1
RFA	Radiofrequenzablation
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SI	Staining intensity
Sirt	Sirtuin
SIRT	Selektive-Interne Radio-Therapie
SRS	Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie
SSA	Somatostatinanaloga
SSTR	Somatostatin-Rezeptor
T	Tumor
TACE	Transarterielle Chemoembolisation
TMA _s	Tissue Mikro Arrays
TP53	Tumor Protein p53
TSA	Trichostatin A

TSC	tuberöse Sklerose
UICC	Union internationale contre le cancer
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
VHL	Von-Hippel-Lindau-Syndrom
WHO	World Health Organization
WRS	Wilcoxon rank sum test
5-JÜR	5-Jahres-Überlebensrate

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	18
Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien.....	18
Definition / Klassifikation	18
Epidemiologie.....	20
Ätiologie	21
Pathologie und Pathogenese	21
Staging und Grading	22
Klinik, Diagnostik und Therapie.....	25
Klinik	25
Diagnostik.....	25
Therapie	27
Histon-Deacetylasen (HDAC) und Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi).....	28
Histon-Deacetylasen (HDAC)	28
Histon-Deacetylase 5 (HDAC5).....	30
Histon-Deacetylasen 9 (HDAC9).....	30
Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi).....	32
Ziel der Arbeit.....	34
Material und Methoden.....	35
Laborgeräte	35
Reagenzien.....	35
Verbrauchsmaterial	35
Antikörper.....	36
Einwegartikel und Plastikwaren	36
Patientenmaterial	36
Klinische Variablen.....	37

Tissue Microarrays.....	37
Immunohistochemie.....	38
Testfärbungen.....	38
Durchführung der Immunhistochemie.....	38
Auswertung der Färbungen.....	39
Statistische Datenanalyse.....	41
Ergebnisse.....	43
Patientenselektion und klinisch-pathologische Parameter.....	43
Expression der HDAC-Variablen im GEP-NEN.....	45
Histologische Untersuchung der HDAC-Expression.....	45
Quantitative Expressionsanalyse der HDAC-Varianten.....	46
Klinisch-pathologische Parameter der untersuchten Patienten mit GEP-NEN.....	47
Korrelation der nukleären HDAC 9 in GEP-NEN mit Überlebensdaten.....	50
Diskussion.....	54
Danksagung.....	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der kovalenten Modifikationen von Histonen und DNA bei der epigenetischen Regulation der Genexpression (Quelle: adaptiert von [39], Abbildung erstellt mit BioRender Software; https://biorender.com/about).....	29
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Einflusses von HATS, HDACs und HDACi auf die Chromatinstruktur und die Transkription (Quelle: adaptiert von [40], Abbildung erstellt mit BioRender Software; https://biorender.com/about).....	33
Abbildung 3: Repräsentative Bilder der Färbung von HDAC5 (links) und HDAC9 (rechts) in gut differenzierten G1 (oben), G2 (Mitte) und schlecht differenzierten G3 (unten) in GEP-NEN. Die Bilder wurden mit 400-facher Vergrößerung aufgenommen und der Maßstabsbalken zeigt 25 µm an.	45
Abbildung 4: Repräsentative Bilder der HDAC5(links) und HDAC9(rechts)-Färbung in Normalgewebe. Die Bilder wurden mit 400-facher Vergrößerung aufgenommen und der Maßstabsbalken zeigt 25µm an..	46
Abbildung 5: X-Tile-Diagramme des prognostischen Markers HDAC9 im GEP-NEN. Dargestellt ist das X-Tile-Diagramm des Gesamtüberlebens (links). Das mittlere Diagramm zeigt die Verteilung der IRS-Werte. X-Tile findet den optimalen Cut-off IRS bei 8 (umrandeter Kreis, links). Dieser Cut-off-Wert wurde auf das Gesamtkollektiv angewendet und als statistisch signifikant ($P = 0,03389$, rechts) befunden.....	51
Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit von der Ausprägung der verschiedenen klinischpathologischen Variablen.	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikations- und Einstufungskriterien für neuroendokrine Neoplasien (NEN) des Gastrointestinaltrakts und der hepatopankreatobiliären Organe (Quelle:[2], [3])	19
Tabelle 2: TNM-Klassifikation der ENETS des Gastrointestinaltrakts (Quelle: [19] – [22])	22
Tabelle 3: TNM-Klassifikation der ENETS des Pankreas (Quelle [19]–[22]).....	23
Tabelle 4: TNM-Klassifikation der ENETS der regionären Lymphknoten (Quelle:[19]–[22])	23
Tabelle 5: Fernmetastase (Quelle:[19] – [22])	24
Tabelle 6: UICC – Stadien (Quelle: [19] – [22])	24
Tabelle 7: Proliferationsbasiertes Grading neuroendokriner Neoplasien des gastroenteropankreatischen Systems (Quelle:[4]).....	24
Tabelle 8: Rollen von HDAC9, seinen Upstream-Regulatoren und seinen Downstream-Targets bei Krebserkrankungen beim Menschen	31
Tabelle 9: Geräte	35
Tabelle 10: Reagenzien	35
Tabelle 11: Verbrauchsmaterial.....	35
Tabelle 12: Antikörper	36
Tabelle 13: Einteilung PP-Score	39
Tabelle 14: Einteilung SI-Score	39
Tabelle 15: Schema zur Auswertung der HRP-Immunhistochemie anhand des IRS; Quelle [74].....	40
Tabelle 16: Patientenkollektiv wie für die Auswertung der Daten verwendet: n=78. Aufgeschlüsselt nach Alter, Geschlecht, Tumorstadium, Lokalisation	43
Tabelle 17: Mediane Expressionswerte der HDAC-Variablen nach IRS-Analyse	46
Tabelle 18: Korrelation der nukleären HDAC5-Expression der primären Tumoren mit klinisch pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Tumorstadium nach TNM sowie Lokalisation	47
Tabelle 19: Korrelation der zytoplasmatischen HDAC5-Expression der primären Tumoren mit klinisch pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Tumorstadium nach TNM sowie Lokalisation	47

Tabelle 20: Korrelation der nukleären HDAC9-Expression der primären Tumoren mit klinisch pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Tumorstadium nach TNM sowie Lokalisation	48
Tabelle 21: Korrelation der zytoplasmatischen HDAC9-Expression der primären Tumoren mit klinisch pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Tumorstadium nach TNM sowie Lokalisation	48
Tabelle 22: Paarweise Vergleiche der nukleären HDAC5-Expression mittels Wilcoxon Test zwischen verschiedenen Geweben	49
Tabelle 23: Paarweise Vergleiche der zytoplasmatischen HDAC5-Expression mittels Wilcoxon Test zwischen verschiedenen Geweben	49
Tabelle 24: Paarweise Vergleiche der nukleären HDAC9-Expression mittels Wilcoxon Test zwischen verschiedenen Geweben	50
Tabelle 25: Paarweise Vergleiche der zytoplasmatischen HDAC9-Expression mittels Wilcoxon Test zwischen verschiedenen Geweben	50
Tabelle 26: Univariate und multivariate Analyse des Gesamtüberlebens zur Identifikation prädikativer Faktoren für das Outcome von Patienten mit GEP-NEN	53

Einleitung

Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien

Definition / Klassifikation

Unter dem Überbegriff gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien (GEP-NEN) wird eine molekular und biologisch sehr heterogene Gruppe von Tumoren des Gastrointestinaltraktes und Pankreas zusammengefasst, deren gemeinsames Merkmal der Ursprung aus neuroendokrinen Zellen ist [1]. Anatomisch und zellbiologisch betrachtet, entstehen diese Tumoren aus Zellverbänden, die embryologische der Neuralleiste entstammen und dem neuroendokrinen System zuzuordnen sind [1]. Abgesehen von den Eigenschaften anderer Tumoren an vergleichbaren Lokalisationen, die durch fortschreitendes Wachstum, Schmerzen und Einschränkungen der Organfunktion verursacht werden, lassen sich GEP-NENs bezüglich ihrer Differenzierung und ihres Wachstumsverhaltens in zwei Hauptgruppen einteilen: Die erste Gruppe beinhaltet gut differenzierte NEN, auch bekannt als neuroendokrine Tumore (NET), während die zweite Gruppe schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome (NEC) umfasst [1].

Die Unterscheidung zwischen neuroendokrinen Tumoren (NET) und neuroendokrinen Karzinomen (NEC) basiert weiterhin auf den histomorphologischen Kriterien einer erhaltenen geordneten Architektur in NET im Vergleich zu einer ungeordneten Architektur in NEC sowie auf der Kernmorphologie und der Proliferationsrate [1].

In der aktuell gültigen WHO-Klassifikation erfolgt eine einheitliche Einteilung der GEP-NEN in drei Kategorien [2],[3]:

- Neuroendokrine Tumoren (NET) mit den Unterkategorien G1, G2 und G3
- neuroendokrine Karzinome (NEC) mit den Unterkategorien klein- und großzellig und
- gemischte neuroendokrine und nicht-neuroendokrine Neoplasien (MiNEN; früher gemischtes adenoneuroendokrines Karzinom (MANEC)).

Neben der intakten Architektur bilden funktionelle Unterschiede (häufig noch erhaltene Hormonexpression) und genetisch distinkte Alterationen die Grundlage für die WHO-Klassifikation der NET [1]. Mutationen in den Genen DAXX und ATRX sind charakteristisch für gut differenzierte NET, während NEC typischerweise Mutationen in

TP53 oder RB1 aufweisen [4]. Genomische Daten haben auch zu einer Änderung der Klassifikation von gemischten NEN geführt, die nun unter dem Begriff "gemischte neuroendokrine - nicht-neuroendokrine Neoplasien (MiNEN)" zusammengefasst werden. Gemischte adenoneuroendokrine Karzinome (MANECs), die nun als MiNEN klassifiziert werden, zeigen genomische Veränderungen, die Adenokarzinomen oder NECs ähnlicher sind als NETs. Diese Veränderungen sind vermutlich das Ergebnis der klonalen Evolution innerhalb der Tumoren und bilden somit ein schnell wachsendes Forschungsgebiet (Tabelle 2) [2], [3].

Tabelle 1: Klassifikations- und Einstufungskriterien für neuroendokrine Neoplasien (NEN) des Gastrointestinaltrakts und der hepatopankreatobiliären Organe (Quelle:[2], [3])

Terminologie	Unterscheidung	Klasse	Mitoserate * (Mitosen/2 mm ²)	Ki-67-Index *
NET, G1	Gut differenziert	Niedrig	<2	<3%
NET, G2		Dazwischenliegend	2–20	3–20 %
NET, G3		Hoch	>20	>20%
NEC, kleinzelliger Typ (SCNEC)	Schlecht differenziert	Hoch	>20	>20%
NEC, großzelliger Typ (LCNEC)			>20	>20%
MiNEN	Gut oder schlecht differenziert	Variabel	Variabel	Variabel

G: Grading; LCNEC: großzelliges neuroendokrines Karzinom; MiNEN: gemischtes neuroendokrines nicht-neuroendokrines Neoplasie; NEC: neuroendokrines Karzinom; NET: neuroendokriner Tumor; SCNEC: kleinzelliges neuroendokrines Karzinom.

Mitoseraten sind als Anzahl der Mitosen/mm² auszudrücken, bestimmt durch Zählen mitosespezifischer Kernformationen in den histopathologischen Präparaten in 50 Feldern von 0,2 mm² (Gesamtfläche von 10 mm²). Der Ki-67-Proliferationsindexwert wird durch Zählen von mindestens 500 Zellen in den Regionen mit der höchsten Markierung (Hot-Spots), die bei Scan-Vergrößerung identifiziert werden, bestimmt. Die endgültige Bewertung basiert darauf, welcher der beiden Proliferationsindizes das Neoplasma in die höhergradige Kategorie einordnet. Schlecht differenzierte NECs werden nicht formal

bewertet, gelten aber per Definition als hochgradig. In den meisten MiNENs sind sowohl die neuroendokrinen als auch die nicht-neuroendokrinen Komponenten schlecht differenziert, und die neuroendokrine Komponente hat Proliferationsindizes im gleichen Bereich wie andere NECs. Diese konzeptionelle Kategorie lässt allerdings die Möglichkeit zu, dass eine oder beide Komponenten gut differenziert sein können. Wenn möglich, sollte daher jede Komponente separat bewertet werden [2], [3].

Epidemiologie

Epidemiologische Daten zeigen in den letzten Jahrzehnten einen weltweiten Anstieg der Prävalenz und Inzidenz von GEP-NEN. Dieser Anstieg ist vermutlich hauptsächlich auf verbesserte Erkennungs- und Diagnoseverfahren zurückzuführen [5].

In Deutschland hat sich die Anzahl der diagnostizierten GEP-NEN zwischen 1976 und 2006 etwa um das Fünffache erhöht. In diesem Zeitraum stieg die Gesamtinzidenz bei Männern signifikant von 0,31 auf 2,27 (pro 100.000 Einwohner pro Jahr) und bei Frauen von 0,57 auf 2,38 an [6]. Im Vergleich zu anderen soliden Tumoren ist die Prognose von NET insgesamt relativ günstig. Das Gesamtüberleben der Patienten variierte je nach Geschlecht, Tumorlokalisierung und Stadium [6]. Die kumulative 5-Jahres-Überlebensrate (JÜR) aller Patienten betrug trotz des vergleichsweise hohen Anteils fortgeschrittener Erkrankungen 78%. Die 5-JÜR variierte in Abhängigkeit von der Lokalisation des Primarius (Vorderdarm 73% vs. Pankreas 70% vs. Jejunum/Ileum 86%) und dem Vorliegen von Metastasen bei Erstdiagnose (72% mit Metastasen vs. 92% ohne Nachweis von Metastasen) [7]. Aktuelle Studien haben signifikante Überlebensunterschiede zwischen verschiedenen Tumormanifestationen gezeigt. NETs im Rektum wiesen die günstigste Prognose auf, während Tumore im Pankreas prognostisch ungünstig waren. Die primäre Tumorlokalisierung könnte somit ein nützlicher Prädiktor für die Prognose von NET-Patienten sein [8]. Betroffene Frauen weisen im Vergleich zu Männern deutlich höhere Überlebensraten auf, insbesondere bei Magen-, Lunge- und Hauttumoren. Dieser Vorteil ist nicht ausschließlich auf den etwas höheren Anteil prognostisch günstigerer NET-Formen bei Frauen zurückzuführen, sondern scheint auch durch die primäre Tumorlokalisierung bedingt zu sein, welche sich im Geschlechtervergleich zu Gunsten weiblicher Patienten unterscheidet [8]. Patienten mit hochgradig malignen neuroendokrinen Karzinomen (NEC) haben im Vergleich zu Patienten mit gutartigem

NET erwartungsgemäß eine deutlich ungünstigere Prognose [9]. Gründe hierfür sind eine geringere Ansprechrate auf neoadjuvante und adjuvante Therapiemodalitäten sowie ein höheres Risiko für das Auftreten lymphogener und hämatogener Metastasen [10]. NEC des Dünndarms und der Appendix weisen ebenfalls eine vergleichsweise günstige Prognose auf, während die relativen 5-JÜR für NEC des Magens, des Kolorektums und des Pankreas gegenüber den NET deutlich abfallen [11]. In univariaten Analysen wurden diverse Risikofaktoren für Mortalität bei NET identifiziert. Diese beinhalten das Vorhandensein von Metastasen, klinischen Symptomen bei Erstdiagnose, einem Primärtumor von mehr als 2,5 cm Größe, einer Wachstumsfraktion von über 5% sowie dem fehlenden Nachweis von Chromogranin A durch immunhistochemische Analyse. Es wurde zudem ermittelt, dass eine fehlende Durchführung chirurgischer Therapie ebenfalls ein Risikofaktor darstellt [7].

Ätiologie

Die Ursachen für die Entstehung von GEP-NEN sind größtenteils unbekannt und es können verschiedene ätiologische Faktoren beteiligt sein [12]. Die genetischen Grundlagen von GEP-NEN bleiben abgesehen von erblichen Formen im Rahmen familiärer Syndrome unklar. Der Verlust des entsprechenden Tumorsuppressorgens in der Keimbahn spielt jedoch eine entscheidende Rolle bei diesen Krankheitsbildern [13]. Bei den vorliegenden Fällen handelt es sich um die multiple endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN-1) und das Von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL) [14]. Das vermehrte Auftreten von GEP-NEN im Magenkorpus bei chronisch atrophischer Gastritis Typ A (CAG) ohne familiäre Vorbelastung ist ein interessantes Phänomen, welches noch nicht vollständig erklärt ist [15].

Pathologie und Pathogenese

Die meisten GEP-NEN treten sporadisch auf. Hierbei zeigen molekulargenetische und pathobiologische genomweite Analysen durch vergleichende genomische Hybridisierung (CGH, Comparative Genomic Hybridization), dass Chromosomenverluste etwas häufiger auftreten als Chromosomengewinne, während Amplifikationen selten sind [16]. Diese können jedoch Teil erbliche Syndrome sein, wie MEN1-Syndrom, Von-Hippel-Lindau-

Syndrom (VHL), von Recklinghausen-Krankheit oder Neurofibromatose Typ 1 (NF-1) und tuberöse Sklerose (TSC). In diesen Fällen spielen die zugrunde liegenden genetischen Anomalien eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von GEP-NEN [16].

Staging und Grading

Im Jahr 2017 erschien die neue WHO-Klassifikation endokriner Tumore (Tabelle 1) [2]. Im Einstufungssystem der WHO von 2010 gab es Diskrepanzen hinsichtlich der Bewertung des Differenzierungsgrades, welche seitdem kontrovers diskutiert wurden [17]. Das Klassifikationssystem der WHO wurde 2017 entsprechend überarbeitet, um die genannten Probleme anzugehen. Eine weitere Überarbeitung des WHO-Klassifikationssystems von 2017 ist die Änderung der Nomenklatur für das gemischte adenoneuroendokrine Karzinom, eine Neoplasie mit Komponenten eines nicht-endokrinen Karzinoms (meist duktales Adenokarzinom oder Azinuszellkarzinom) in Kombination mit einer NEN, also einer gemischten endokrinen, nicht-endokrinen Neoplasie (MiNEN) [17]. Die TNM-Klassifikation und die Stadieneinteilung gelten für gut differenzierte NET des Gastrointestinaltraktes und des Pankreas. Schlecht differenzierte NEC werden entsprechend den Kriterien für Karzinome der jeweiligen Lokalisation klassifiziert [18]. Zugrundeliegende Kriterien der WHO-Klassifikation wie Differenzierung und Proliferation wurden beibehalten. Lokalisation, Tumorgröße, Tumorausbreitung und Angioinvasion wurden dagegen in die TNM-Stadieneinteilung verlagert [19]. (Tabelle 3,4,5,6 Quelle:[19] – [22])

Tabelle 2: TNM-Klassifikation der ENETS des Gastrointestinaltrakts (Quelle: [19] – [22])

Magen	
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Primärtumor nicht nachweisbar
Tis	In-situ-Tumor / Dysplasie (Durchmesser <0,5mm)
T1	Invasion von Lamina propria oder Submukosa und Durchmesser <1cm
T2	Invasion der Muscularis propria oder Subserosa oder Durchmesser >1cm
T4	Invasion von benachbarten Organen
Duodenum	
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Primärtumor nicht nachweisbar
T1	Invasion von Mukosa oder Submukosa und Durchmesser <1cm
T2	Invasion der Muscularis propria oder Durchmesser >1cm
T3	Invasion von Pankreas, Retroperitoneum oder Subserosa
T4	Invasion von Peritoneum oder anderen Organen
Ileum	

Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Primärtumor nicht nachweisbar
T1	Invasion von Mukosa oder Submukosa und Durchmesser ≤ 1 cm
T2	Invasion der Muscularis propria oder Durchmesser > 1 cm
T3	Invasion von Subserosa
T4	Invasion von Peritoneum oder umgebender Organe
Appendix	
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Primärtumor nicht nachweisbar
T1	Durchmesser < 1 cm, Invasion von Submukosa oder Muscularis propria
T2	Durchmesser < 2 cm, Invasion von Submukosa oder Muscularis propria und/oder minimale (< 3 mm), Invasion der Subserosa / Mesoappendix
T3	Durchmesser > 2 cm und/oder ausgedehnte (> 3 mm), Invasion von Subserosa/Mesoappendix
T4	Invasion von Peritoneum oder umgebender Organe
Kolon und Rektum	
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Primärtumor nicht nachweisbar
T1	Invasion von Mukosa oder Submukosa - T1a: Durchmesser < 1 cm - T1b: Durchmesser 1-2cm
T2	Invasion der Muscularis propria oder Durchmesser > 2 cm
T3	Invasion von Subserosa, perikolischem oder perirektalem Fettgewebe
T4	Invasion umgebender Organe oder Perforation der Serosa

T: Tumor; N: Nodus; M: Metastase, ENETS: European Neuroendocrine Tumor Society; UICC Union for International Cancer Control; NEN: neuroendokrine Neoplasien.

Tabelle 3: TNM-Klassifikation der ENETS des Pankreas (Quelle [19]–[22])

Pankreas	
Tx	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Primärtumor nicht nachweisbar
T1	beschränkt auf das Pankreas, Größe < 2 cm
T2	beschränkt auf das Pankreas, Größe 2-4cm
T3	beschränkt auf das Pankreas, Größe > 4 cm oder mit Invasion von Duodenum oder Gallengang
T4	Infiltration großer Gefäße (Truncus coeliacus oder A. mesenterica superior) oder eines der folgenden Organe: Magen, Milz, Kolon, Nebenniere

T: Tumor

Tabelle 4: TNM-Klassifikation der ENETS der regionären Lymphknoten (Quelle:[19]–[22])

N – Regionäre Lymphknoten	
Nx	Regionäre Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen

N: Regionäre Lymphknoten

Tabelle 5: Fernmetastase (Quelle:[19] – [22])

M0	Keine Fernmetastase
M1	Fernmetastase

M: Metastase,

Tabelle 6: UICC – Stadien (Quelle: [19] – [22])

UICC-Stadium	TNM
Stadium I	- T1 N0 M0
Stadium II	- T2, T3 N0 M0
Stadium III	- T4 N0 M0 - Jedes T N1 M0
Stadium IV	- Jedes T - Jedes N M1

UICC: Union internationale contre le cancer

Die TNM-Stadieneinteilung für GEP-NEN ermöglicht eine standardisierte onkologische Stratifizierung und erlaubt eine detaillierte Prognoseabschätzung. Sie ist die Grundlage für eine stadiengerechte onkologische Therapie, die heutzutage jeder Behandlung von NEN zugrunde liegen sollte und auch für die Durchführung von Studien mit größeren Tumorkollektiven erforderlich ist [4].

Für die prognostische Einschätzung von GEP-NEN ist die Bestimmung der Proliferation ein entscheidender Faktor, da die Proliferation innerhalb dieser Tumoren unterschiedlich sein und sich im Verlauf ändern kann [4]. Die proliferative Aktivität einer GEP-NEN wird durch die Bestimmung des Ki-67/MIB-1-Index im Schnittpräparat ermittelt. Alternativ können die Mitosen ausgezählt werden. Es werden 3 Gruppen unterschieden [4] (Tabelle 7).

Tabelle 7: Proliferationsbasiertes Grading neuroendokriner Neoplasien des gastroenteropankreatischen Systems (Quelle:[4])

Grad	Mitosen (10 HPF) ^a	Ki-67/MIB-1-Index (%) ^b
G1	<2	≤2
G2	2–20	3–20
G3	>20	>20

G: Grading,

1. ^ain 10 HPF Hochleistungsfeld = 2 mm², mind. 40 Felder (Gebiete mit höchster mitotischer Dichte).

2. ^b *Ki-67/MIB-1* Antikörper, in % von 500–1000 Tumorzellen in „Hot-Spot-Arealen“.

Die proliferative Aktivität der GEP-NEN hat in Verbindung mit den klinisch-bildgebenden Befunden unmittelbare therapeutische Konsequenz, da sich die Therapieschemata deutlich an der proliferativen Aktivität und der Differenzierung orientieren [19].

Klinik, Diagnostik und Therapie

Klinik

Die klinische Symptomatik endokriner Tumoren hängt wesentlich davon ab, ob die Tumoren endokrin aktiv sind, d. h. ob sie unreguliert Hormone sezernieren oder nicht [23].

GEP-NEN werden nicht selten im asymptomatischen Stadium als Zufallsbefund im Rahmen einer z.B. bildgebenden Diagnostik diagnostiziert. Andernfalls häufig aufgrund einer lokalen Komplikation des Tumors durch mechanische Einwirkung wie Organkompression oder Verdrängung von Leitungsbahnen, die z.B. ein abdominelles Druckgefühl oder Schmerzen bis hin zum Ileus auslösen [1].

Etwa 30 % der GEP-NEN sind hormonell aktiv und können spezifische klinische Symptome hervorrufen. Spezifische Symptome werden durch Hormone wie Insulin (Hypoglykämie), Gastrin (rezidivierende Ulzera), Serotonin (Flush, Diarrhoe) und Glukagon (Diabetes mellitus, Hautveränderungen) ausgelöst. Diese charakteristische Symptomatik tritt häufig erst in einem fortgeschrittenen Stadium auf, so dass GEP-NEN oftmals erst in fortgeschrittenen Stadien entdeckt werden. Die Früherkennung eines spezifischen Hormonsyndroms kann die Tumordiagnose und -therapie entscheidend beeinflussen [24].

Diagnostik

Je nach Lokalisation und funktioneller Aktivität einer GEP-NEN kommen unterschiedliche diagnostische Verfahren und Laboruntersuchungen zum Einsatz. Die laborchemische Bestimmung von Chromogranin A (CGA) ist sehr sensitiv, aber relativ unspezifisch für NEN. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Patienten mit Niereninsuffizienz, Herzinsuffizienz, Lebererkrankungen und Patienten, die mit Protonenpumpeninhibitoren (PPI) behandelt werden, erhöhte Chromograninspiegel im Blut aufweisen [25]. Ein weiterer Parameter ist die Bestimmung von 5-

Hydroxyindolessigsäure im angesäuerten Urin. Diese ist ein Abbauprodukt von Serotonin und sollte bestimmt werden, wenn Patienten über Symptome wie Diarrhoe oder Flush berichten [24].

Gastroskopie und Koloskopie sind unverzichtbare Untersuchungsmodalitäten in der Diagnostik neuroendokriner Tumoren des Magens, des Duodenums, des Kolons und des Rektums. Durch den inzwischen weit verbreiteten Einsatz der Gastroskopie und Koloskopie im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen werden heute viele GEP-NEN als Zufallsbefund diagnostiziert [25]. Zur besseren Beurteilung des Tumorstadiums im Magen, Duodenum sowie Rektum sollte die Endosonographie hinsichtlich der Infiltrationstiefe eingesetzt werden. Darüber hinaus wird die Endosonographie auch zur Lokalisation und Beurteilung von NEN im Pankreas angewendet [25].

Im Rahmen der Diagnostik und Beurteilung des Tumorstadiums spielen zudem bildgebende Verfahren wie die Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) eine zentrale Rolle [26]. Die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie (SRS) und die Somatostatin-Rezeptor (SSTR)-Positronen-Emissions-Tomographie (PET) haben einen hohen Stellenwert [24, 25]. 70–90 % der gastrointestinalen und 50–80 % der pankreatischen GEP-NEN exprimieren den Somatostatinrezeptor 2 (SSTR2). Nach radioaktiver Markierung können Somatostatinanaloga (SSA) als Tracer verwendet und mit nuklearmedizinischen Methoden nachgewiesen werden. Mit diesem molekularen Bildgebungsverfahren können Patienten über die Tumormanifestation hinaus als Kandidaten für die Peptid-Rezeptor-Radionuklid-Therapie (PRRT) identifiziert werden [1]. In der heutigen Zeit stehen zahlreiche PET-Tracer zur Verfügung, die auf unterschiedlichen molekularen Mechanismen beruhen: Die PET-Tracer, die an SSTR binden, eignen sich besonders zum Nachweis gut differenzierter NET mit hoher SSTR-Expression und geringer Proliferationsrate [1]. Einer der am besten etablierten Tracer ist ⁶⁸Gallium (⁶⁸Ga)-DOTATATE (DOTA-DPhe1, „Tyr3-octreotate“). ⁶⁸Ga-DOTA-TOC-PET zeigt eine signifikant höhere Detektionsrate im Vergleich zur konventionellen Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie und diagnostischen CT mit klinischer Relevanz bei einer signifikanten Anzahl von Patienten, da sich Ga-DOTATATE als überlegen in der Detektion von Skelett-, Lymphknoten- und Lebermetastasen im Subzentimeterbereich erwiesen hat [26, 27, 28].

Therapie

Die Therapie der ersten Wahl ist die chirurgische Resektion des Tumors mit einem primär kurativen Ansatz, wenn dies möglich ist [30]. Je nach Lokalisation, Differenzierung und Ausdehnung der Erkrankung reicht das Spektrum der Eingriffe von organerhaltenden minimalinvasiven Resektionsverfahren bis hin zu ausgedehnten multiviszeralen Resektionen [31].

Zur chirurgischen Therapie neuroendokriner Metastasen kolorektalen Ursprungs liegen keine spezifischen Daten vor. Generell wird jedoch empfohlen, resektable Metastasen von gut differenzierten GEP-NETs kurativ chirurgisch zu behandeln, wenn extrahepatische Tumormanifestationen, eine diffuse Peritonealkarzinose sowie eine relevante Rechtsherzinsuffizienz (durch NET-assoziierte Endokardfibrose) ausgeschlossen werden können [32], [33]. Die chirurgische Resektion wird je nach Ausdehnung und Lokalisation der Filiae ein- oder zweizeitig durchgeführt. Bei vollständiger Resektion liegen die 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 60 % und 80 % mit einer Mortalität von bis zu 5 % [34]. Bei den seltenen schlecht differenzierten Tumoren wird eine Operation von neuroendokrinen Metastasen nicht als sinnvoll erachtet [33]. Bei fehlender chirurgischer Resektabilität oder nur teilweise resektablen Befunden stellen lokal ablative oder zytoreduktive Verfahren wie die transarterielle Chemoembolisation (TACE), die Radiofrequenzablation (RFA), die laserinduzierte Thermotherapie (LITT) und in Einzelfällen die Organtransplantation therapeutische Alternativen dar. Darüber hinaus sollten selektive interne Radiotherapie (SIRT), Biotherapien, Radiopeptidtherapien und Chemotherapien als neoadjuvante, adjuvante oder alternative Therapien in Betracht gezogen werden [30]–[34]. Bei allen Patienten mit metastasierten NET sollte vor einem chirurgischen Eingriff eine interdisziplinäre Beratung erfolgen, um die optimale individuelle Therapiestrategie unter Berücksichtigung der medikamentösen Therapiealternativen sowie des Alters und Zustands des Patienten festzulegen [25].

Eine medikamentöse Therapie ist bei gut differenzierten GEP-NEN in metastasierten inoperablen Erkrankungsstadien indiziert [1]. Die Unterteilung in nicht-pankreatische vs. pankreatische Tumoren ist für die Therapieentscheidung elementar, da nur panNET in relevantem Ausmaß chemosensibel sind. Aufgrund der höheren Ansprechraten sollte die Chemotherapie gegenüber den molekular zielgerichteten Therapien vorgezogen werden [1].

Die genaue Kenntnis der biologischen und molekularen Eigenschaften von NET hat die Tür zur Identifizierung neuer pharmakologischer Ansatzpunkte geöffnet. Zu den therapeutischen Optionen gehören Somatostatin-Analoga allein oder in Kombination mit Interferon- α , Multi-Targeting-Tyrosinkinase-Inhibitoren (z. B. Sunitinib) oder Säugetier-Target-of-Rapamycin (mTOR)-Inhibitoren (z. B. Everolimus). Antiangiogenetische Ansätze und anti-Insulinähnliche Wachstumsfaktor-Rezeptor (IGFR)-Verbindungen wurden ebenfalls als Kombinationstherapien mit den oben genannten Substanzen vorgeschlagen [35].

Die Biotherapie von NEN ist seit Langem etabliert und besteht heutzutage hauptsächlich aus der Behandlung mit SSA und Interferon- α [1]. SSA sind zyklische Oktapeptide mit hemmender Wirkung auf Somatostatinrezeptoren (SSTR). Sie werden in der Erstlinientherapie der G1- und G2 (Ki-67 < 10%) -NEN mit niedriger bis mittlerer Tumorlast empfohlen.

Neuere randomisierte kontrollierte Studien haben das Wissen über die Häufigkeit von Nebenwirkungen im Zusammenhang mit der Biotherapie erweitert. Kürzlich wurden neue zielgerichtete Medikamente, wie der Rapamycin-Inhibitor Everolimus und der multiple Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib, in die Therapie der NET eingeführt [36]. Die antiproliferative Therapie der metastasierten, nicht resektablen NEN hat einen progressionsverzögernden und stabilisierenden Effekt. Es konnte bisher in keiner Studie eine Verlängerung des Überlebens nachgewiesen werden [32].

Histon-Deacetylasen (HDAC) und Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi)

Histon-Deacetylasen (HDAC)

Histon-Deacetylasen (kurz HDACs) sind Enzyme, die die Modifikation von Histonen beeinflussen. Sie entfernen Acetylgruppen von acetylierten Lysinmolekülen am N-Terminus von Histonen. Dadurch beeinflussen direkt die Transkription der genetischen Information und die epigenetische Repression sowie die Kontrolle des Zellzyklus und der Entwicklung des Organismus. HDACs werden durch DNA-Methylierung aktiviert und bilden einen Repressorkomplex (Abbildung 1). In Tumorzellen findet sich ein besonders hoher Anteil an HDACs. Von der Hypermethylierung sind oft bevorzugt Kontrollgene wie Tumorsuppressorgene, Gene zur Kontrolle des Zellzyklus und DNA-Reparaturgene

betroffen [37]. HDACs werden daher als epigenetische Targets bei Krebs, Neurodegeneration, Entzündungen und Stoffwechselstörungen angesehen [38].

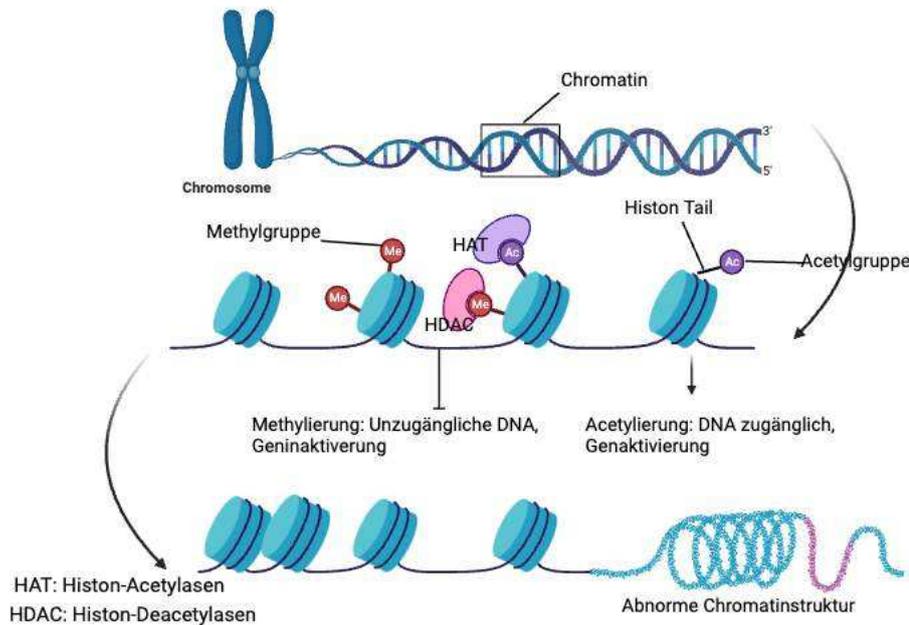


Abbildung 1: Schematische Darstellung der kovalenten Modifikationen von Histonen und DNA bei der epigenetischen Regulation der Genexpression (Quelle: adaptiert von [39], Abbildung erstellt mit BioRender Software; <https://biorender.com/about>).

Die HDAC-Familie umfasst 18 humane HDAC-Mitglieder, die aufgrund ihrer Homologie und Struktur in die Klassen I-IV eingeteilt werden [40]. Klasse I (HDAC1, 2, 3 und 8), Klasse II (unterteilt in Klasse IIa HDAC4, 5, 7 und 9 und Klasse IIb HDAC6 und 10), Klasse III, auch Sirtuin genannt (Sirt 1-7) und Klasse IV (HDAC11). Die Klassen I, II und IV reagieren empfindlich auf eine Vielzahl von pharmakologischen Breitband-HDAC-Inhibitoren [41]. Die Existenz von 18 HDACs deutet darauf hin, dass sie unter normalen und pathologischen Bedingungen sehr spezifische Rollen im Organismus spielen können. Die Deletion der Gene einzelner HDACs in Mäusen hat ihre hochspezifischen biologischen Funktionen bestätigt [42]. Dies ist besonders deutlich für HDACs der Klasse IIa. Seit ihrer Entdeckung ist bekannt, dass sie Enzyme mit erheblicher Bedeutung für die Entwicklung und Differenzierung von Zellen darstellen. HDACs der Klasse IIa scheinen daher vielversprechende therapeutische Ziele zu sein. Humangenetische Ansätze, einschließlich Ultra-Sequenzierungstechniken der nächsten Generation, bieten uns die Möglichkeit, die Expressionsniveaus von HDACs der Klasse

Ila zu messen und ihre Mutations- und Deletionsmuster bei menschlichen Krankheiten zu verstehen [42].

Histon-Deacetylase 5 (HDAC5)

HDAC5 gehört zur HDAC-Klasse Ila (HDAC 4, 5, 6 und 9) und ist sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert [43]. Die Effekte einer spezifischen Hemmung von HDAC5 in Krebszellen wurden untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von HDAC5 eine eisenabhängige Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induziert, die letztlich zum apoptotischen Zelltod und zu Mechanismen der mitochondrialen Qualitätskontrolle (Mitophagie und Mitobiogenese) führt [41]. Interessanterweise erfolgt die Anpassung von HDAC5-depletierten Zellen an oxidativen Stress durch die Umprogrammierung von Stoffwechselwegen in Richtung Glukose und Glutamin. Daher bietet sich in vivo ein Einblick in eine wertvolle klinische Strategie, die die selektive Hemmung von HDAC5 mit verschiedenen Stoffwechsellinhibitoren als neue Therapie zur Abtötung von Krebszellen kombiniert [41]. HDAC5 wurde stark in Geweben von Mammakarzinom exprimiert und eine erhöhte HDAC5-Expression war mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert. Ein Knockdown von HDAC5 führte in der Zellkultur zu gehemmter Zellproliferation, -migration und -invasion sowie verstärkter Apoptose [44]. Der HDAC5-Inhibitor LMK-235 hemmte das Wachstum von Brustkrebszellen und löste Apoptose aus. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HDAC5 ein vielversprechender prognostischer Marker und Wirkstofftarget beim Mammakarzinom ist. Darüber hinaus konnte die Wirkung von LMK-235 durch die gleichzeitige Gabe von Bortezomib, einem Proteasominhibitor, der bei der Behandlung des multiplen Myeloms Anwendung findet, synergistisch verstärkt werden. Die Kombination von LMK-235 und Bortezomib stellt somit eine vielversprechende Strategie zur Behandlung des Mammakarzinoms dar [44].

Histon-Deacetylasen 9 (HDAC9)

HDAC9 ist ein Mitglied der Familie der Histondeacetylasen der Klasse Ila. Dieses Enzym kann frei zwischen Zellkern und Zytoplasma hin- und herpendeln und fördert die gewebespezifische Transkriptionsregulation durch Interaktion mit Histon- und Nicht-Histon-Substraten [45]. HDAC9 spielt eine wichtige Rolle bei verschiedenen

physiologischen Prozessen wie der Entwicklung des Herzmuskels, der Knochenbildung, der Differenzierung von Adipozyten und der angeborenen Immunität [45]. Aktuelle Untersuchungen zeigten, dass eine erhöhte Expression von HDAC9 in vielen verschiedenen Tumorzellen zu finden ist. In diesen Zellen verändert HDAC9 die Expression und Aktivität zahlreicher relevanter Proteine durch Interaktion mit Transkriptionsrepressoren und onkogenen Proteinen, die zur Karzinogenese beitragen [45]. HDAC9 könnte die Immunantwort gegen den Tumor beeinflussen, indem es die Infiltration von zytotoxischen T-Zellen, dendritische Zellen (DC) und T-Helferzellen in die Mikroumgebung des Tumors reduziert [45]. Die Beiträge von HDAC9 zu bestimmten Malignomen wurden weltweit untersucht. Aktuelle Informationen, die eine abnormale Expression von HDAC9 mit verschiedenen Tumoren und verwandten Transkriptionsfaktoren in Verbindung bringen, sind in Tabelle 8 zusammengefasst [45].

Tabelle 8: Rollen von HDAC9, seinen Upstream-Regulatoren und seinen Downstream-Targets bei Krebserkrankungen beim Menschen

Krebstyp	Zellen und Gewebe	Rollen	Ref.
Glioblastom (GBM)	Gliomgewebe und primäre Gliomzellen und menschliche GBM-Zelllinien U87 und LN229	Fördert das GBM-Zellwachstum und die Tumorbildung	[46]
Medulloblastom (MB)	Primärtumorgewebe von MB-Patienten	Erhöht die Rate des Zellwachstums und der Überlebensfähigkeit	[47]
Brustkrebs (BC)	Serum von rezidivierenden BC- und TNBC-Patienten und TNBC-Zelllinien MDA-MB-231, MDA-MB-1739 und HCC1395	Fördert die Invasion und Tumorangio-genese	[48], [49]
	Tumorgewebe von BC-Patienten und humane BC-Zelllinien MCF-7 und BT474	Fördert die Proliferation, Migration und Invasion von BC-Zellen	[50]
	Aggressive BC-Zelllinien, einschließlich der luminalen Zelllinien ZR75, T47D, SKBR3, BT474 und HCC1500 sowie der Basalzelllinien HCC1937, SUM149, MDA231, MDA436, Hs578T, BT549 und HBL100	Fördert die Proliferation und reduziert die Apoptose von Zielzellen	[51]
	Paclitaxel-resistentes TNBC MDA-MB-231 und Tumorgewebe von BC-Patienten	Erhöht die Paclitaxel-Resistenz bei TNBCs	[52]

Krebstyp	Zellen und Gewebe	Rollen	Ref.
	ER α -negatives Tumorgewebe eines BC-Patienten und ER α -negative BC-Zelllinien MDA-MB231 und MDA-MB436	Erhöht die Antiöstrogenresistenz in BC-Zellen	[53]
Hepatozelluläres Karzinom (HCC)	Tumorgewebe von HCC-Patienten, differenzierte HCC-Zelllinien HepG2 und HuH1, HCC-Zelllinien Hep3B, Huh7 und PLC, undifferenzierte HCC-Zelllinien HLE und HLF und OXA-resistente HCC-Zellen	Erhöht das Zellwachstum, reduziert die Apoptose und erhöht das verankerungsunabhängige Zellwachstum	[54]–[58]
Duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC)	PDAC-Gewebe und Zelllinien CFPAC-1, HPAC, SW1990 und Capan-2	Fördert die Proliferation und Migration von PDAC-Zellen	[59]
Osteosarkom	Tumorgewebe von Osteosarkom-Patienten und Osteosarkom-Zelllinien U2OS und MG63	Fördert die Zellproliferation und -invasion	[60]
Akute lymphatische Leukämie im Kindesalter (ALL)	Knochenmarkproben von Kindern mit ALL		[61], [62]
Akute myeloische Leukämie (AML)	AML-Zelllinie HL60, induziert mit Natriumvalproat		[62], [63]
Lungenkrebs; nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (NSCLC)	Tumorgewebe von NSCLC-Patienten und NSCLC-Zelllinien SK-MES-1, H522, H460 und A549	Fördert die Zellproliferation, reduziert die Zellapoptose und verstärkt das Fortschreiten von NSCLC	[64]–[66]
Blasenkrebs (BCa)	BCa-Zelllinien 5637 und T24 und Urin von Patienten, bei denen Urothel-BCa diagnostiziert wurde	Fördert die Zellproliferation, -migration und -invasion und reduziert die Zellapoptose	[67], [68]

Ref.: Referenz

Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi)

Histon-Deacetylase-Inhibitoren (kurz HDACi) sind eine große Gruppe verschiedener Moleküle, die intrinsisch in der Lage sind, die Zellproliferation in verschiedenen Krebszelllinien zu hemmen. Die apoptotischen Effekte beruhen auf Veränderungen in der Expression von regulierenden Tumorsuppressorgenen, welche in Verbindung mit der Modifikation des Histonacetylierungsstatus stehen. Letzterer stellt ein entscheidendes

Ereignis im Chromatin-Remodelling dar: Eine lockere Chromatinstruktur ist Voraussetzung für die Bindung von Transkriptionsfaktoren und die Bildung von Transkriptionskomplexen, während ein kompakt organisiertes Chromatin mit starker Affinität zwischen Histonen und DNA jegliche Transkription blockiert (Abbildung 2) [69].

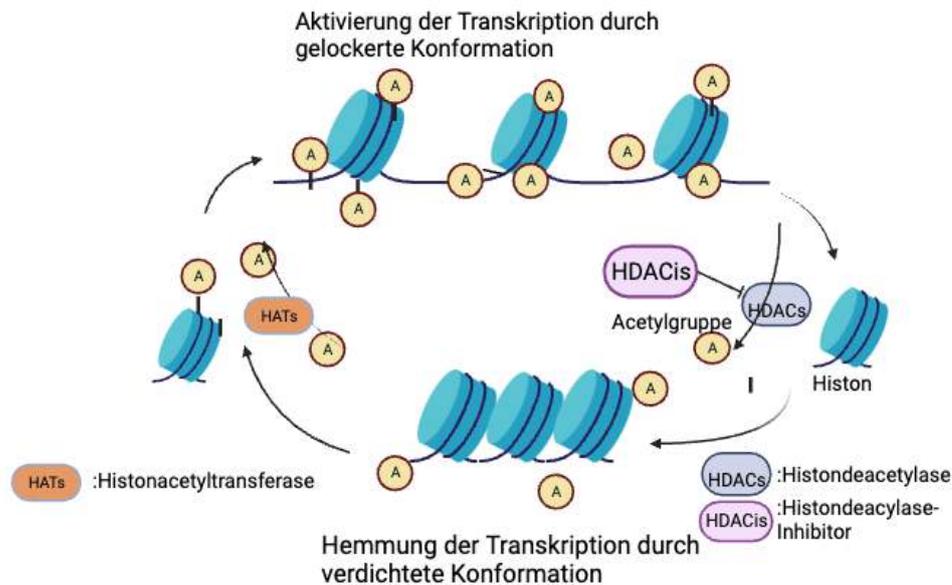


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Einflusses von HATS, HDACs und HDACi auf die Chromatinstruktur und die Transkription (Quelle: adaptiert von [40], Abbildung erstellt mit BioRender Software; <https://biorender.com/about>).

Ein vielversprechender neuer Therapieansatz ist die Beeinflussung des Zellzyklus durch Antikörper, die HDACi initiieren können. Unselektive HDAC-Inhibitoren zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vielversprechende antitumorale Aktivitäten. Aufgrund ihrer starken antikanzerogenen Wirkung werden derzeit zahlreiche HDACi in verschiedenen klinischen Studien getestet [41].

Ziel der Arbeit

NEN-GEP umfassen eine Gruppe von Tumoren mit großer Heterogenität bezüglich ihres proliferativen und endokrinen Verhaltens. Ebenso breit ist das Spektrum der klinischen Verläufe: Auf der einen Seite stehen asymptomatische Tumoren, die zufällig in bildgebenden Verfahren oder bei der histologischen Aufarbeitung von Operationspräparaten diagnostiziert werden. Auf der anderen Seite stehen klinisch rasch progrediente Verläufe bei Tumoren mit hoher Proliferationsrate und aggressivem Metastasierungspotenzial [70]. Aus diesem Grund stellen NEN-GEP nicht nur eine diagnostische, sondern auch eine therapeutische Herausforderung dar. Typischerweise werden spezifische Laborwerte bestimmt, sogenannte Tumormarker wie Chromogranin A und Synaptophysin. Diese sind in der Regel bei funktionellen NET nachweisbar. Es handelt sich um sehr sensitive Tumormarker, die jedoch keinen Aufschluss über den zugrundeliegenden NET-Typ, die Lokalisation oder die Ausdehnung der Erkrankung geben.

Für die Entwicklung wirksamer Therapien sind Proteine von Interesse, die an der Initiierung des Zelltods involviert sind und Tumorzellen zum Absterben bringen, sowie Proteine, die die Zellteilung regulieren und damit das Tumorwachstum möglichst verlangsamen. Die hier untersuchten Proteine HDAC5 und -9 sind solche Zellzyklusmodulatoren.

Bisher liegen nur wenige Daten zur immunhistochemischen Expression und biologischen Funktion von HDACs in GEP-NEN vor. Die Identifizierung der Expressionsmuster dieser Proteine, insbesondere gegen HDAC5 und -9, die vermutlich in allen Tumorentitäten überexprimiert werden, könnte daher entscheidend zu einer differenzierteren und zielgerichteten Therapie und einem besseren Outcome von Patienten mit neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NEN) beitragen [71].

Ziel dieser Studie ist es daher, die Expression von HDAC5 und -9 in Tumor- und Normalgewebeproben von Patienten mit GEP-NENs immunhistochemisch zu analysieren und zu quantifizieren. Insbesondere soll untersucht werden, ob eine Assoziation zwischen der Expression von HDAC5 und -9 und klinisch-pathologischen Variablen sowie dem Überleben der Patienten besteht. Es soll geprüft werden, ob die genannten HDACs als prognostische Marker und neue Zielstrukturen für therapeutische Ansätze bei der Behandlung von Patienten mit GEP-NEN dienen können.

Material und Methoden

Laborgeräte

Tabelle 9: Geräte

Geräte	Hersteller
Cryoschneider	SLEEMainz
Feinwaage	Voyager PRO
Fettstift	DAKO
Gefrierschrank	Termo electron corporation
Kühlschrank	Liebherr
Mikroskop	Leica
Mikrotom	Leica
Ofen	MEMMERT
Pipettierhilfe	Integra Bioscience
Pipetten	Eppendorf
Reagenzglasmixer	VWR
Schüttelinkubator	Eppendorf
Wärmerschrank	Memmert
Wasserbad	Laude
Zentrifuge	Hettich

Reagenzien

Tabelle 10: Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
ABC-Kit (ZytoChme-Plus HRP-Kit, HRP008DAB)	Zytomed
Antibody Diluent	Zytomed Systems
Aqua dest.	Gibco
Corbitlösung	Merck
DAB Substrate Kit High Contrast	Zytomed Systems
DPBS	Gibco
Entellan	Merck
H ₂ O ₂	Merck
Mayers Hämalau	Merck
PBS-Tabletten	MBT Brand
10x Target Retrieval Solution	Dako
Tween 20	Gibco
Xyclo reinst	Merck

Verbrauchsmaterial

Tabelle 11: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Ethanol 99,5-70%	Merck

Liquid Blocker Super Pap Pen Min (Pappen)	MBT Brand
Objektträger	Eppendorf VWR
Deckgläschen	Eppendorf VWR
Pipettierspitzen	Star Lab

Antikörper

Tabelle 12: Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-HDAC 5 antibody ab 109446	abcam
Anti-HDAC 9 antibody ab 55403	abcam
X0903	Dako

Die für die Immunhistochemie verwendeten HDAC5- und -9-Antikörper waren Rabbit-IgG-Antikörper von abcam (HDAC5 polyklonaler Antikörper; HDAC9 monoklonaler Antikörper). Als Sekundärantikörper für die Färbung wurde ein HRP-gekoppelter Anti-Rabbit-IgG-Sekundärantikörper eingesetzt. Für initiale Testfärbungen wurde außerdem der Rabbit-Isotyp-Antikörper Dako X0903 der Firma Dako verwendet.

Einwegartikel und Plastikwaren

Die verwendeten Einwegartikel und Kunststoffe stammten von den Firmen Costar, Eppendorf, Falcon und StarLab.

Patientenmaterial

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine retrospektive Studie, in der die Tumorproben aller Patienten mit GEP-NEN untersucht wurden, die zwischen Januar 1998 und Dezember 2017 in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) behandelt wurden. Patienten mit unzureichenden Tumorproben oder zu wenig Gewebe wurden ausgeschlossen.

Von einem Teil des Patientenkollektivs lagen bereits fertige Tumorpräparate in Form von Tissue Mikroarrays (TMAs) vor, die nach der gleichen, nachfolgend beschriebenen Methode angefertigt worden waren. Sie waren zu einem früheren Zeitpunkt von Mitarbeitern des chirurgischen Forschungslabors der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und

Kinderchirurgie hergestellt und uns für die Untersuchung zur Verfügung gestellt worden. Zusätzlich wurden 5 normale Gewebeproben von Patienten mit GEP-NEN aus den Jahren 2003 bis 2019 als Negativkontrollen untersucht. Insgesamt standen zu Beginn 208 Proben von 78 Patienten zur Verfügung.

Die Angaben zur TNM-Klassifikation (Tumorgröße, Invasion umliegender Arterien, Lymphknoten und Fernmetastasen) und zum Stadium wurden den pathologischen Originalbefunden entnommen. Die Einteilung der Tumorstadien erfolgte nach der 7. Auflage der UICC TNM-Klassifikation für gastrointestinale und pankreatische NEN [72].

Für die Entnahme der Gewebeproben zu Forschungszwecken lag eine Genehmigung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Düsseldorf mit der Studiennummer 3821 vor.

Klinische Variablen

Klinisch-pathologische Parameter wie Gesamtüberleben, krankheitsfreies Überleben, Alter zum Zeitpunkt der Operation, Geschlecht, Ergebnisse der Nachuntersuchung und Zeitpunkt der Diagnose wurden erfasst und in einer Excel-Tabelle zusammengetragen. Die erfassten Parameter waren Alter, Geschlecht, TNM-Stadium, Grading, R-Status und Tumorlokalisierung.

Tissue Microarrays

TMA sind eine Methode, repräsentative Stanzbiopsien von verschiedenen Tumorarealen aus einem Paraffinblock zu entnehmen und in einem neuen Paraffinblock zusammenzuführen. Auf diese Weise kann das Gewebe mehrerer Patienten oder Blöcke auf demselben Objektträger immunhistochemisch untersucht werden. Dies geschieht durch die Verwendung einer Nadel zur Biopsie von verschiedenen Patienten aus einem histologischen Standardschnitt und die Platzierung dieses Gewebes (des Kerns) auf einem Paraffinblock des Empfängers. Diese Technik ermöglicht die Maximierung der Gewebsressourcen durch die Analyse kleiner Kernbiopsien von Blöcken anstelle kompletter Schnitten [73].

Für die Studie wurden formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt und daraus Gewebe-Microarrays konstruiert. Jeder Microarray enthielt für jeden Patienten

zwei repräsentative Gewebestanden des Primärtumors, der Fernmetastase bzw. der befallenen Lymphknoten. Von jedem Patienten wurden Gewebestücke mit einem Durchmesser von 1,0 mm entnommen und im Abstand von 0,5 mm in neue Paraffinblöcke eingebettet. Für die immunhistochemische Untersuchung wurden Gewebeschnitte mit einer Dicke von 2 µm angefertigt.

Immunhistochemie

Testfärbungen

Um eine optimale und selektive Antikörperkonzentration auf den Tumorzellen zu erreichen, wurden Testfärbungen mit den Primärantikörpern HDAC5 und -9 (Firma abcam; ab55403;1mg/ml und ab109446;1,198mg/ml) in drei verschiedenen Verdünnungen durchgeführt. Die jeweilige Antikörperkonzentration wurde mit Hilfe eines Lösungsmittels (Antibody Diluent ZUC025-100, Firma Zytomed Systems, DAB500plus) hergestellt. Es wurden drei verschiedene Verdünnungen getestet (1:400, 1:200 und 1:100). Die optimale Färbung wurde bei einer Verdünnung von 1:200 erreicht. Eine Positivkontrolle wurde durchgeführt, indem eine in Paraffin eingebettete Probe aus Tonsille, Duodenum, NEC-DUE1 und NEC-DUE2, von denen bekannt ist, dass sie HDAC5 und -9 sicher exprimieren, mit dem zu untersuchenden Antikörper HDAC5 und -9 angefärbt wurde. Als Negativkontrolle diente die Färbung mit einem Isotyp-Antikörper (Dako X0903, Verdünnung 1:1000).

Durchführung der Immunhistochemie

Die Gewebepräparate wurden zweimal für jeweils 10 Minuten in Xylol entparaffiniert und dann zweimal für jeweils 2 Minuten in Alkohol (99,5 %, 96 %, 80 % und 70 % Ethanol) in absteigender Reihenfolge rehydriert. Anschließend wurden die Proben mindestens 5 Minuten in Aqua dest. gegeben. Zur Demaskierung wurden die Schnitte in Retrieval Solution 30 Minuten bei maximaler Leistung in der Mikrowelle erhitzt und anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Nach 5-minütigem Waschen mit PBS und 0,1 % Tween 20 wurden die Objektträger getrocknet und die Schnitte mit einem Super Pap Pen Mini umrandet. Die endogene Peroxidase wurde durch Inkubation der Schnitte mit 3,0 % H₂O₂-PBS für 10 Minuten inhibiert, um eine unspezifische Reaktion zu vermeiden. Die Schnitte wurden dreimal für je 2 Minuten mit PBS und 0,1% Tween 20 gewaschen und für 10 Minuten in der Blocking-Lösung des ZytoChem-Plus

HRP Kits inkubiert. Nach erneutem Waschen für 2 Minuten mit PBS und 0,1% Tween 20 wurden die Schnitte für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper inkubiert. Die 1:200-Verdünnung des Primärantikörpers erfolgte mit 3,75 µl Antikörper und 746,25 µl Antibody Diluent. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 2 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (biotinylierter Antikörper) für 15 Minuten. Die Schnitte wurden dreimal gewaschen und 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Enzymkonjugat inkubiert. Nach fünfminütigem Waschen mit destilliertem Wasser wurden zur Visualisierung zwei Tropfen DAB-Substrat auf die Schnitte gegeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln bis zur gewünschten Farbintensität (5 bis 15 Minuten) inkubiert. Die Kernfärbung mit Mayer's Haemalaun erfolgte nach einem weiteren Waschschrift von 5 Minuten für 15 Sekunden und einem anschließenden Waschschrift von 5 Minuten. Die Schnitte wurden dann jeweils eine Minute lang in einer aufsteigenden Reihe von Alkoholen (70 %, 80 % und 90 % Ethanol) inkubiert, dann für mindestens zwei Minuten in Xylol getaucht und mit Entellan eingedeckt.

Auswertung der Färbungen

Die Bilder wurden mit der Mikroskopsoftware Leica Application Suite (Version, Leica, Deutschland) aufgenommen. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen wurden mit einer leicht modifizierten Version des Immunreaktiven Scores (IRS) nach Remmele und Stegner ausgewertet [74]. Bei der mikroskopischen Untersuchung wurde der Prozentsatz der positiv gefärbten Zellen (PP-Score = percentage points) und zur Abschätzung der Färbeintensität der SI-Score (SI = staining intensity) bestimmt. Der PP-Score konnte Werte von 0 bis 4 annehmen, die sich aus dem jeweiligen Prozentsatz des gefärbten Tumorgewebes ergaben (Tabelle 13).

Tabelle 13: Einteilung PP-Score

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

PP: Percentage points

Die SI-Werte konnten zwischen 0 und 3 liegen. Sie wurden zur Skalierung der Farbintensität verwendet. Die Werte definierten vom Untersucher erhobene Intensitäten, die in Tabelle 14 dargestellt sind.

Tabelle 14: Einteilung SI-Score

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

SI-Score: Staining intensity

Der IRS ergab sich schließlich aus der Multiplikation des PP-Scores mit dem entsprechenden SI-Score ($IRS=PP \times SI$). Dieser konnte Werte zwischen 0 und 12 annehmen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Schema zur Auswertung der HRP-Immunhistochemie anhand des IRS; Quelle [74]

Farbintensität	Keine positive Färbung(0)	<10% positive Färbung (1)	10-50% positive Färbung(2)	51-80% positive Färbung(3)	>80% positive Färbung(4)
Keine Farbreaktion (0)	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
Schwache Farbreaktion(1)	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3	IRS = 4
Mäßige Farbreaktion(2)	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6	IRS = 8
Starke Farbreaktion(3)	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9	IRS = 12

IRS: Immunreaktiver Score

Wenn Gewebeproben eines Tumorkompartiments, von Primärtumoren, Lymphknoten und Fernmetastasen sowie von Normalgewebe vorlagen und vollständig ausgewertet werden konnten, wurden die Mittelwerte der IRS-Expression von HDAC5 und -9 für das Tumorzentrum berechnet. War dies nicht der Fall, wurde nur der Wert der vorhandenen Gewebeprobe für die Berechnung verwendet. Die Bewertung der HDAC5- und HDAC9-Expression bzw. deren optimaler Cut-off-Wert wurde mit der Software X-tile Version 3.6.1 (Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA) bestimmt (Zitat: X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization. Camp RL, Dolled-Filhart M, Rimm DL. Clin Cancer Res. 2004 Nov 1;10(21):7252-9. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0713. X-tile-Plots wurden erstellt, indem die Markerdaten (HDAC5- bzw. HDAC9-IRS) in zwei Populationen unterteilt wurden: niedrige und hohe Expression. Die Assoziationen wurden für jede Unterteilung mit dem Log-Rank-Test für Überleben berechnet. Die Daten wurden grafisch in einem rechteckigen Raster dargestellt, wobei jeder Punkt (Pixel) die Daten einer bestimmten Gruppe von Unterteilungen repräsentiert. Die vertikale Achse stellt alle möglichen "hohen" Populationen dar, wobei die Größe der hohen Population von oben nach unten zunimmt. Entsprechend stellt die horizontale Achse alle möglichen "niedrigen" Populationen dar, wobei die Größe der niedrigen Population von links nach rechts

zunimmt. Die Daten entlang der Hypotenuse stellen die Ergebnisse eines einzigen Schnittpunktes dar, der die Daten in hohe und niedrige Untergruppen teilt. Für jede mögliche Unterteilung der Grundgesamtheit wird ein χ^2 -Wert berechnet, der in der Tabelle durch einen Farbcode dargestellt wird. Die Färbung des Diagramms stellt die Stärke der Assoziation für jede Unterteilung dar und reicht von schwach (dunkel, schwarz) bis stark (hell, grün oder rot). Umgekehrte Assoziationen zwischen Markerexpression und Überleben (z. B. eine hohe Expression bedeutet ein geringeres Überleben) sind rot gefärbt, während direkte Assoziationen grün gefärbt sind. Der Cursor kann manuell über jeden Schnittpunkt bewegt werden, um die Überlebenskurven anzuzeigen. Die optimale Unterteilung der Daten wurde anhand des höchsten χ^2 -wertes gewählt. Die statistische Signifikanz wird anhand des aus dem Datensatz abgeleiteten Cut-Points mit Hilfe eines standardmäßigen Log-Rank-Tests bewertet, wobei die P-Werte aus einer Lookup-Tabelle ermittelt werden.

Statistische Datenanalyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit IBM SPSS Statistics für Windows (Version 29.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und der Software R (Version 4.1.3) unter Verwendung der Pakete mice und survival.

Die Expression der HDAC-Varianten in Tumor- und Normalgewebe wurde mit dem Wilcoxon Test (auch "Wilcoxon rank-sum test", kurz: WRS) verglichen. Die Korrelation zwischen den Expressionsniveaus von HDAC-Varianten und klinisch-pathologischen Variablen wurde mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test (Whitney 1947) untersucht. Ein zweiseitiger P-Wert unter 0,05 zeigte statistische Signifikanz an.

Der optimale Cut-off-Wert für TNM-Stadium, Grading, Geschlecht und Alter zur Unterscheidung der HDAC-Varianten wurde mit der Software X-tile ermittelt [75].

Die Auswertung des Überlebens umfasste das Gesamtüberleben, definiert als \geq die Zeit zwischen Operation und letztem Follow-up oder Tod (unabhängig von der Ursache), sowie das krankheitsfreie Überleben. Für die univariaten Überlebenszeitanalysen wurde der Median berechnet und die Patienten in zwei Gruppen eingeteilt (\geq Median und $<$ Median). Die Überlebenskurven wurden mit der Kaplan-Meier-Analyse geschätzt und die Überlebensunterschiede mit dem Log-Rank-Test verglichen. Eine multiple proportionale Hazard-Cox-Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um den prognostischen Wert von

HDAC-Varianten und klinisch-pathologischen Variablen zu untersuchen. Dazu wurden Hazard Ratios mit einem 95% Konfidenzintervall berechnet.

Für jeden Patienten wurde das TNM-Stadium anhand der TNM-Klassifikation der 7. Auflage des UICC-Klassifikationssystems bestimmt, Kaplan-Meier-Überlebenskurven für jedes TNM-Stadium für das krebspezifische Überleben (CSS) erstellt und mit dem Log-Rank-Test statistisch ausgewertet. Schließlich wurde der prognostische Wert des UICC-Staging-Systems (7. Auflage) mit der Cox-Proportional-Hazard-Regressionsanalyse getestet. Das Paket generiert mehrere Imputationen (Ersatzwerte) für multivariate fehlende Daten.

Für komplexe unvollständige Daten wurde die multivariate Imputation durch verkettete Gleichungen (MICE) verwendet [76]. Unser multivariates Cox-Regressionsmodell wurde für TNM-Stadium, Alter, Geschlecht und Tumorlokalisation angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ angenommen.

Ergebnisse

Patientenselektion und klinisch-pathologische Parameter

Die Auswertung der deskriptiven Statistik des Kollektivs ergab ein medianes Alter von 65 Jahren. Der jüngste Patient war zum Zeitpunkt der Diagnose 29 Jahre alt, der älteste 90 Jahre. An der Studie nahmen 37 männliche (47,4%) und 41 weibliche (52,6%) Patienten teil. Die Ausbreitung des Primärtumors (T-Stadium), der positive oder negative Lymphknotenstatus (N-Stadium), das Vorhandensein von Fernmetastasen (M-Stadium), der Differenzierungsgrad (Grading) und der Resektionsstatus (R-Status) wurden den pathologischen Befunden und klinischen Berichten entnommen. Für die nachfolgenden Untersuchungen zur Ausbreitung des Primärtumors wurden die Stadien T1 und T2 (33; 42,3%) als niedriges Stadium, die Stadien T3 und T4 (39; 50%) als fortgeschrittenes Stadium und das unklare T-Stadium (6; 7,7%) zusammengefasst. Bei 34 Patienten (43,6%) wurden keine Lymphknotenmetastasen (N0), bei 39 Patienten (50%) Lymphknotenmetastasen (N+) nachgewiesen. 5 Patienten (6,4%) hatten einen unklaren N-Status. 50 (64,1%) Patienten hatten keine Fernmetastasen und 27 (34,6%) hatten Fernmetastasen. 1 Patient (1,3%) hatte einen unklaren M-Status.

Für die statistische Auswertung wurden die Differenzierungsgrade G1 und G2 (57; 73,1%) zusammengefasst und G3 (21; 26,9%) gegenübergestellt. Durch die chirurgische Resektion konnte bei 65 (83,3%) Patienten eine R0-Situation erreicht werden. Bei 10(12,8%) Patienten war eine mikroskopisch komplette Resektion (R1) und bei 2(2,6%) Patienten eine makroskopisch komplette Resektion (R2) nicht möglich. 1 Patient (1,3%) hatte einen unklaren R-Status. Die häufigste Tumorentität in der untersuchten Population waren NET des Pankreas (pNET) (42,3%), gefolgt von Tumoren des Dünndarms (23,1%) und des Kolons (21,8%). Tumoren des Magens waren mit 12,8% am seltensten vertreten.

Tabelle 16 fasst die deskriptiven Statistiken des Patientenkollektivs zusammen.

Tabelle 16: Patientenkollektiv wie für die Auswertung der Daten verwendet: n=78. Aufgeschlüsselt nach Alter, Geschlecht, Tumorstadium, Lokalisation

Variabel	Patienten in (%)
Total	78 (100.00)
Alter	
Median	65 (29-90)
≤ 65	43 (55,1)
> 65	35 (44,9)

Geschlecht	
Männlich	37 (47,4)
Weiblich	41 (52,6)
Tcomb	
T 1+2	33 (42,3)
T 3+4	39 (50)
Unbekannt	6 (7,7)
Ncomb	
N negativ	34 (43,6)
N positiv	39 (50)
Unbekannt	5 (6,4)
Fernmetastase	
Negativ	50 (64,1)
Positiv	27 (34,6)
Unbekannt	1 (1,3)
Gcomb	
G1 + 2	57 (73,1)
G3	21 (26,9)
Resektionsstatus	
R0	65 (83,3)
R1	10 (12,8)
R2	2 (2,6)
Unbekannt	1 (1,3)
Lokalisation	
Pankreas	33 (42,3)
Colon	17 (21,8)
Dünndarm	18 (23,1)
Magen	10 (12,8)

T: Tumor, Tcomb: kombinierte T-Stadien, N:Nodus, Ncomb: kombinierte N-Stadien, G: Grading, Gcomb: kombinierte G-Stadien, R: Resektionsstatus

Die mittlere Nachbeobachtungszeit betrug 46,64 Monate (Spanne: 0 - 174 Monate). Während dieser Zeit verstarben 26 Patienten. Bei 8 Patienten war eine Nachbeobachtung nicht möglich.

Expression der HDAC-Variablen im GEP-NEN

Histologische Untersuchung der HDAC-Expression

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung konnte die Expression des nukleären und zytoplasmatischen HDAC5 und 9 für 67 bzw. 63 Patienten verifiziert werden. Sowohl das nukleäre HDAC9 als auch das zytoplasmatische HDAC5 konnten immunhistochemisch im Primärtumor, in Lymphknotenmetastasen und in Fernmetastasen im Vergleich zum Normalgewebe signifikant vermehrt nachgewiesen werden. Dagegen wurden das nukleäre HDAC5 und das zytoplasmatische HDAC9 vergleichsweise schwächer angefärbt.

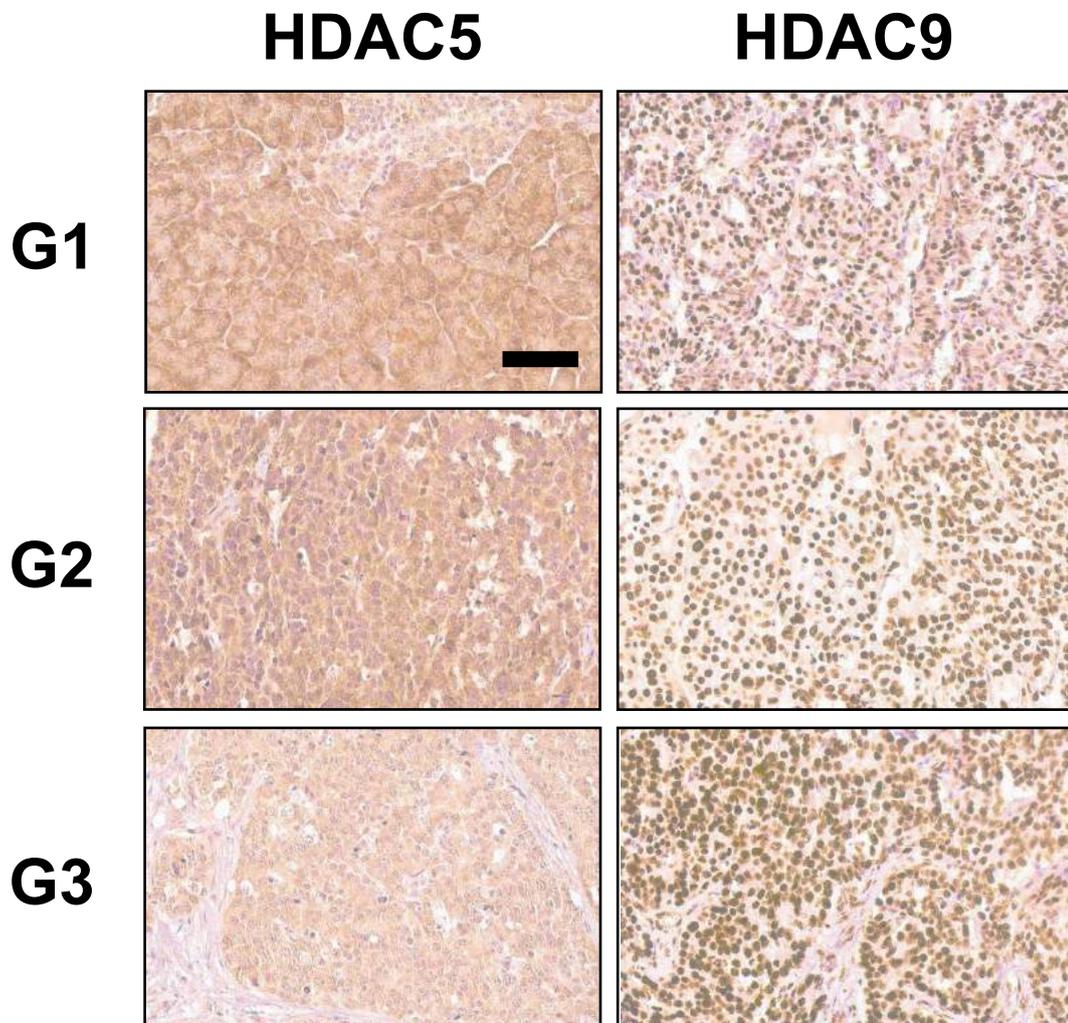
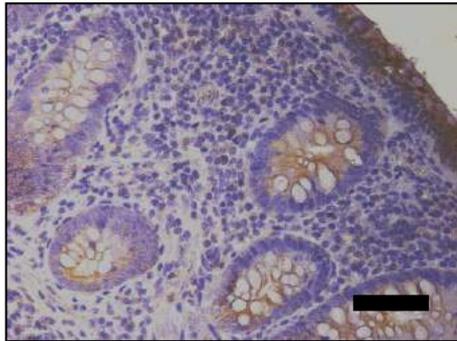


Abbildung 3: Repräsentative Bilder der Färbung von HDAC5 (links) und HDAC9 (rechts) in gut differenzierten G1 (oben), G2 (Mitte) und schlecht differenzierten G3 (unten) in GEP-NEN. Die Bilder wurden mit 400-facher Vergrößerung aufgenommen und der Maßstabsbalken zeigt 25 µm an.

HDAC5



HDAC9

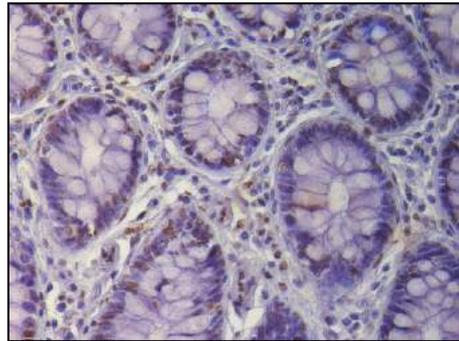


Abbildung 4: Repräsentative Bilder der HDAC5(links) und HDAC9(rechts)-Färbung in Normalgewebe. Die Bilder wurden mit 400-facher Vergrößerung aufgenommen und der Maßstabsbalken zeigt 25µm an..

Quantitative Expressionsanalyse der HDAC-Varianten

Die IRS-Analyse zur Quantifizierung der Immunhistochemie zeigte eine signifikant erhöhte Expression sowohl des nukleären HDAC9 als auch des zytoplasmatischen HDAC5 im Primärtumor und in Lymphknoten und Fernmetastasen im Vergleich zum Normalgewebe. Anhand der vorliegenden Gewebeproben konnte die Expressionsstärke der HDAC-Variablen als Median des IRS in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation ermittelt werden (Tabelle 17). Der IRS-Wert für die zytoplasmatische HDAC9-Expression lag im Median bei 9,0 und zeigte somit den stärksten Effekt, gefolgt von dem für die zytoplasmatische HDAC5-Expression im Primärtumor und in der Fernmetastase. Der IRS-Wert für die nukleäre HDAC5-Expression lag im Median bei 1,5 und war am niedrigsten.

Tabelle 17: Mediane Expressionswerte der HDAC-Variablen nach IRS-Analyse

Expression	Median (IRS)
Primärtumor der nukleären HDAC5	2,0
Primärtumor der zytoplasmatischen HDAC 5	8,0
Primärtumor der nukleären HDAC9	7,5
Primärtumor der zytoplasmatischen HDAC9	3,0
Lymphknoten der nukleären HDAC5	1,5
Lymphknoten der zytoplasmatischen HDAC5	7,0

Lymphknoten der nukleären HDAC9	9,0
Lymphknoten der zytoplasmatischen HDAC9	4,0
Normalgewebe der nukleären HDAC 5	0
Normalgewebe der nukleären HDAC9	2,0
Normalgewebe der zytoplasmatischen HDAC9	0
Fernmetastase der nukleären HDAC5	2,0
Fernmetastase der zytoplasmatischen HDAC5	8,0
Fernmetastase der zytoplasmatischen HDAC9	4,0

Klinisch-pathologische Parameter der untersuchten Patienten mit GEP-NEN

Die ermittelten Werte wurden hinsichtlich Geschlechts, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Fernmetastasierung verglichen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der HDAC5-Expression, weder nukleär noch zytoplasmatisch (Tabelle 18, 19).

Tabelle 18: Korrelation der nukleären HDAC5-Expression der primären Tumoren mit klinisch pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Tumorstadium nach TNM sowie Lokalisation

HDAC5-Expression (nukleär)		
Variable	Median (IRS)	p-Wert
Geschlecht		
Männlich	2	0,6691
Weiblich	2	
Tumorstadium		
T1+T2	2,75	0,6569
T3+T4	2,5	
Lymphknoten		
Negativ	3	0,3825
Positiv	2	
Grading		
G1+G2	2	0,7106
G3	2	
Fernmetastase		
Negativ	2	0,6898
Positiv	2,5	

G: Grading

Tabelle 19: Korrelation der zytoplasmatischen HDAC5-Expression der primären Tumoren mit klinisch pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Tumorstadium nach TNM sowie Lokalisation

HDAC5-Expression (zytoplasmatisch)		
Variable	Median (IRS)	p-Wert
Geschlecht		

Männlich	8	0,2199
Weiblich	7,5	
Tumorstadium		0,4558
T1+T2	7,75	
T3+T4	8	
Lymphknotenmetastase		0,07377
Negativ	8	
Positiv	6	
Grading		0,2884
G1+G2	8	
G3	8	
Fernmetastase		0,5518
Negativ	8	
Positiv	7,75	

IRS: Immunreaktiver Score

Die ermittelten Werte wurden hinsichtlich Geschlechts, Tumorstadium, Lymphknotenstatus und Fernmetastasierung verglichen. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der HDAC-9-Expression bezüglich des Gradings sowohl nukleär ($p=0,04647$) als auch zytoplasmatisch ($p=0,0358$) (Tabelle 20, 21).

Tabelle 20: Korrelation der nukleären HDAC9-Expression der primären Tumoren mit klinisch pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Tumorstadium nach TNM sowie Lokalisation

HDAC9-Expression (nukleär)		
Variable	Median (IRS)	p-Wert
Geschlecht		0,9554
Männlich	7,75	
Weiblich	7,5	
Tumorstadium		0,591
T1+T2	7,5	
T3+T4	7,5	
Lymphknotenmetastase		0,3628
Negativ	7,5	
Positiv	8,75	
Grading		0,04647*
G1+G2	7,5	
G3	8,75	
Fernmetastase		0,5778
Negativ	7,5	
Positiv	7,5	

T: Tumor, G: Grading,

*= $p<0,05$

Tabelle 21: Korrelation der zytoplasmatischen HDAC9-Expression der primären Tumoren mit klinisch pathologischen Faktoren wie Geschlecht, Tumorstadium nach TNM sowie Lokalisation

HDAC9-Expression (zytoplasmatisch)		
Variable	Median (IRS)	p-Wert
Geschlecht		
Männlich	4	0,5282
Weiblich	2	
Tumorstadium		
T1+T2	4	0,09467
T3+T4	2	
Lymphknotenmetastase		
Negativ	3	0,7949
Positiv	4	
Grading		
G1+G2	4	0,0358*
G3	0,5	
Fernmetastase		
Negativ	3,5	0,2803
Positiv	1,5	

T: Tumor, G: Grading,

*= $p < 0,05$

Die paarweise Analyse mittels Wilcoxon Tests ergaben signifikante Unterschiede in der nukleären HDAC-5-Expression im Vergleich zwischen Primärtumorgewebe und Normalgewebe ($p=0,023$) (Tabelle 22).

Tabelle 22: Paarweise Vergleiche der nukleären HDAC5-Expression mittels Wilcoxon Test zwischen verschiedenen Geweben

	DM	LK	No
LK	0,896		
No	0,229	0,128	
PT	0,407	0,360	0,023*

PT: Primärtumor, LK: Lymphknotenmetastase, No: Normalgewebe, DM: Fernmetastase

*= $p < 0,05$

Die paarweise Analyse mittels Wilcoxon Tests ergaben signifikante Unterschiede in der zytoplasmatischen HDAC5-Expression beim Vergleich von Primärtumorgewebe mit Normalgewebe ($p=0,00075$), Lymphknotenmetastasen und Normalgewebe ($p=0,00284$) sowie Fernmetastasen und Normalgewebe ($p=0,00366$) (Tabelle 23).

Tabelle 23: Paarweise Vergleiche der zytoplasmatischen HDAC5-Expression mittels Wilcoxon Test zwischen verschiedenen Geweben

	DM	LK	No
LK	0,53161		
No	0,00366*	0,00284*	
PT	0,57598	0,59347	0,00075*

PT: Primärtumor, LK: Lymphknotenmetastase, No: Normalgewebe, DM: Fernmetastase

*= $p < 0,05$

Die paarweise Analyse mittels Wilcoxon-Tests ergaben signifikante Unterschiede in der nukleären HDAC9-Expression beim Vergleich von Primärtumorgewebe und Normalgewebe ($p=0,0017$), Lymphknotenmetastase und Normalgewebe ($p=0,0024$) sowie Fernmetastase und Normalgewebe ($p=0,0058$) (Tabelle 24).

Tabelle 24: Paarweise Vergleiche der nukleären HDAC9-Expression mittels Wilcoxon Test zwischen verschiedenen Geweben

	DM	LK	No
LK	0,7938		
No	0,0058*	0,0024*	
PT	0,1786	0,0352	0,0017*

PT: Primärtumor, LK: Lymphknotenmetastase, No: Normalgewebe, DM: Fernmetastase

*= $p < 0,05$

Die paarweise Analyse mittels Wilcoxon Tests ergaben signifikante Unterschiede in der zytoplasmatischen HDAC9-Expression im Vergleich von Primärtumorgewebe und Normalgewebe ($p=0,028$), Lymphknotenmetastase und Normalgewebe ($p=0,027$) sowie Fernmetastase und Normalgewebe ($p=0,028$) (Tabelle 25).

Tabelle 25: Paarweise Vergleiche der zytoplasmatischen HDAC9-Expression mittels Wilcoxon Test zwischen verschiedenen Geweben

	DM	LK	No
LK	0,645		
No	0,028*	0,027*	
PT	0,248	0,270	0,028*

PT: Primärtumor, LK: Lymphknotenmetastase, No: Normalgewebe, DM: Fernmetastase

*= $p < 0,05$

Korrelation der nukleären HDAC 9 in GEP-NEN mit Überlebensdaten

Mit Hilfe der X-tile-Software wurde für das nukleäre HDAC9 der optimale Cut-off anhand der Daten von 56 Patienten, von denen sowohl die IRS als auch die Überlebensdaten zur Verfügung standen, bei einem IRS von 8 mit dem größten χ^2 -Wert

von 4,4732 (p = 0,03389) ermittelt (Abbildung 13).

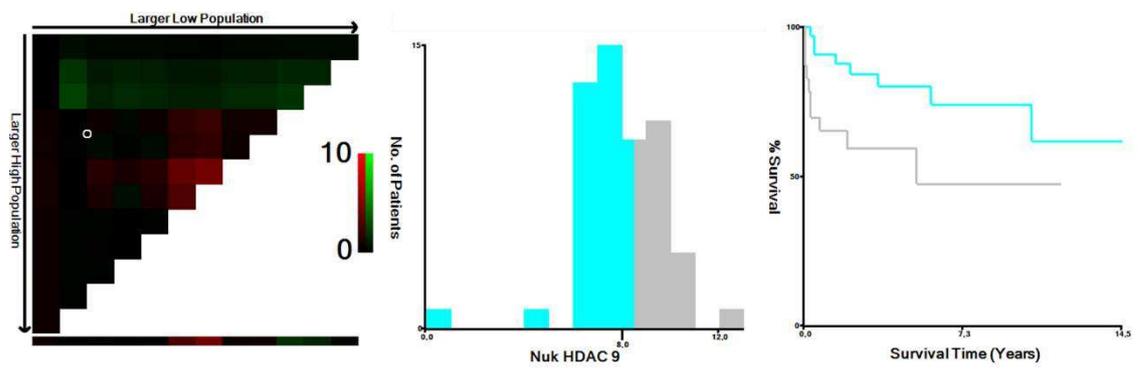


Abbildung 5: X-Tile-Diagramme des prognostischen Markers HDAC9 im GEP-NEN. Dargestellt ist das X-Tile-Diagramm des Gesamtüberlebens (links). Das mittlere Diagramm zeigt die Verteilung der IRS-Werte. X-Tile findet den optimalen Cut-off IRS bei 8 (umrandeter Kreis, links). Dieser Cut-off-Wert wurde auf das Gesamtkollektiv angewendet und als statistisch signifikant ($P = 0,03389$, rechts) befunden.

Für die zytoplasmatischen HDAC9 und HDAC5 konnte hingegen kein optimaler Cut-off-Wert gefunden werden, der signifikant mit der Prognose assoziiert war.

Der nächste Schritt bestand in der Imputation der fehlenden Variablen mit Hilfe des MICE-Algorithmus. Mit diesem vervollständigten Datensatz, der uns eine Überlebenszeitanalyse von 78 Patienten ermöglichte, erstellten wir zunächst Kaplan-Meier-Kurven (Abbildung 14) für Patientenalter ($< \text{Median}$ versus $\geq \text{Median}$), Geschlecht, Grading (G1+G2 versus G3), Tumorlokalisierung (Pan = Pankreas, CR = Colorektal, Si = Dünndarm, Sto = Magen), Ausdehnung des Primärtumors (T1+T2 versus T3+T4), Fernmetastasierung (M0 versus M1), Lymphknotenmetastasierung (N negativ versus N positiv) und Expression des nukleären HDAC9 mit einem IRS von 8 als Schwellenwert für niedrige Expression (IRS bis 8) und hohe Expression (IRS >8). Lediglich zwischen dem Geschlecht und dem Gesamtüberleben konnte in dieser Analyse kein prognostischer Zusammenhang festgestellt werden.

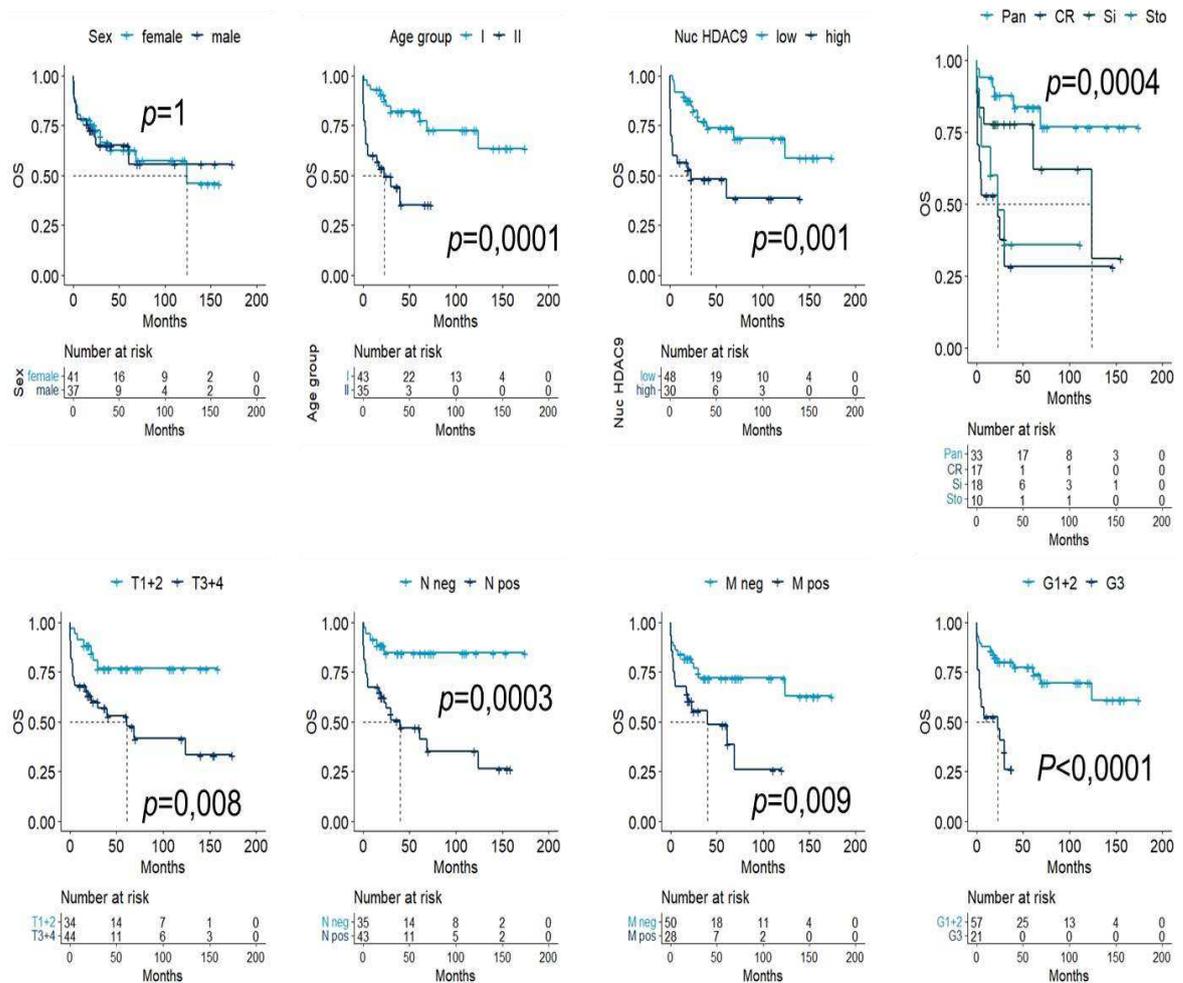


Abbildung 6: Kaplan-Meier-Kurven für das Gesamtüberleben (OS) in Abhängigkeit von der Ausprägung der verschiedenen klinischpathologischen Variablen.

Sodann wurden univariate und multivariate Cox-Regressionsanalysen durchgeführt, um Faktoren zu identifizieren, die das Outcome von Patienten mit GEP-NEN vorhersagen können. Zunächst wurden alle klinisch-pathologischen Variablen einer univariaten Analyse unterzogen.

In der univariaten Überlebenszeitanalyse war eine erhöhte Expression von nukleärem HDAC9 mit einem signifikant schlechteren Gesamtüberleben der Patienten assoziiert ($p=0,00212$). Darüber hinaus waren ein höheres Alter ($p=0,000335$), das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ($p=0,00108$) und die Tumorlokalisation insbesondere im Kolon ($p=0,000286$) und Magen ($p=0,004292$) signifikant mit dem ungünstigen Gesamtüberleben korreliert. Bei Betrachtung des Tumorgradings zeigte sich ein

signifikanter Überlebensvorteil der Patienten mit besser differenzierten Gewebeproben (G1/2) gegenüber derer mit G3-Tumoren ($p=0,000144$) (Tabelle 26).

In der multivariaten Analyse bestätigten sich die HDAC9-Expression ($p=0,00000157$), das Alter ($p=0,0000104$) und der N-Status ($p=0,0000104$) als negative Prädiktoren für das Überleben (Tabelle 26).

Tabelle 26: Univariate und multivariate Analyse des Gesamtüberlebens zur Identifikation prädikativer Faktoren für das Outcome von Patienten mit GEP-NEN

Variabel	Univariate Analyse			Multivariate Analyse		
	HR	95% CI	p-Wert	HR	95% CI	p-Wert
PT-NucHDAC9	3,192	1,522-6,693	0,00212*	10,013	3,910-25,64	0,00000157*
Geschlecht	0,9983	1,002-0,4788	0,996	-	-	-
Alter	4,436	1,965-10,01	0,000335*	8,363	3,252-21,50	0,0000104*
T1/2 vs. T3/4	3,0227	1,289-7,088	0,011	-	-	-
N0 vs. N1	5,001	1,905-13,13	0,00108*	9,867	3,433-28,36	0,0000104*
M0 vs. M1	2,594	1,227-5,483	0,0126	-	-	-
G1/2 vs. G3	4,684	2,113-10,38	0,000144*	-	-	-
Colon	6,577	2,377-18,196	0,000286*	-	-	-
Dünndarm	2,290	0,737-7,117	0,152006	-	-	-
Magen	5,363	1,694-16,981	0,004292*	-	-	-

PT-NucHDAC9: nukleäres HDAC9 im Primärtumor, T: Tumor, N: Nodus, M: Metastase, G: Grading

*= $p<0,05$

Diskussion

GEP-NENs stellen keinen homogenen Tumortyp dar, sondern weisen ein hohes Maß an biochemischer, molekularer und genetischer Heterogenität auf, sodass die Behandlungsentscheidungen für jeden Patienten höchst individuell getroffen werden müssen [1]. Mehr als ein Fünftel der GEP-NEN-Patienten haben zum Zeitpunkt der Diagnose eine metastasierte Erkrankung. Sie haben im Allgemeinen eine ungünstigere Prognose [10], [77], [78]. Eine wesentliche Aufgabe zukünftiger Forschungs- und Behandlungsansätze besteht darin, einerseits valide prädiktive Tumormarker zu identifizieren und andererseits personalisierte Behandlungskonzepte sowohl medikamentös als auch chirurgisch zu entwickeln [1].

Histon-Deacetylasen(HDACs) sind Enzyme, die für die Deacetylierung der aminoterminalen Enden von Histonen verantwortlich sind. Die hierdurch vermittelten Chromatin-Modifikationen regulieren die Transkription und viele andere Prozesse im Zellkern [79]. Durch HDAC-vermittelte Hypoacetylierung kann auch die Aktivität von Nicht-Histon-Proteinen reguliert werden [80]. Es ist bekannt, dass HDACs eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebs beim Menschen spielen, und zwar über verschiedene Wirkmechanismen, die für die Förderung von Krebsmerkmalen verantwortlich sind. [81]. Mehrere Studien konnten belegen, dass HDACi das Wachstum verschiedener Tumore sowohl in vitro als auch in vivo hemmen, was zu vielversprechenden Ergebnissen als neue Therapieoptionen führte [82]–[85]. HDACi sind für nicht transformierte Zellen oder Gewebe relativ ungiftig, haben aber selektive zytotoxische Wirkungen gegen eine Vielzahl von Krebszellen [83], [86]. Daher gelten HDACi als vielversprechende neue Krebsmedikamente. Mehrere HDACi werden bereits als neue Klasse zielgerichteter Krebsmedikamente zur Behandlung von soliden und hämatologischen Malignomen entwickelt und, von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen, eingesetzt [87]–[89]. Vorinostat[87], Belinostat[90] und Panobinostat[89] zusammen mit Romidepsin[88], einem selektiven HDAC1- und -2-Hemmer, gehören zu den zugelassenen Pan-HDACi, die alle HDAC inhibieren. Mehrere weitere HDAC-Inhibitoren befinden sich derzeit in verschiedenen Phasen der klinischen Prüfung und werden möglicherweise in den nächsten Jahren von der FDA zugelassen [91].

Die immunhistochemische Analyse humaner GEP-NEN-Proben zeigte eine hohe Expression verschiedener HDAC-Subtypen im Vergleich zu gesundem endokrinen

Gewebe [71]. Die spezielle Rolle der HDACs in GEP-NEN ist derzeit kaum untersucht und nicht eindeutig geklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von HDAC5 und -9 in Geweben von Patienten mit GEP-NEN immunhistochemisch analysiert, quantifiziert und mit klinisch-pathologischen Faktoren sowie Überlebensdaten der Patienten korreliert.

Die Studienlage zur HDAC-Expression in GEP-NEN ist noch sehr begrenzt. Es gibt jedoch vereinzelte Publikationen, die auf eine mögliche Bedeutung von HDACs bei der Entstehung von GEP-NEN hinweisen. Daher konnten nur wenige Studien zum Vergleich mit den von uns erhobenen Daten herangezogen werden.

Eine der erwähnenswerten Studien ist die von Klieser et al. In dieser Studie wurde die Expression von HDACs immunhistochemisch untersucht und mit klinisch-pathologischen Faktoren und Überlebensdaten von Patienten verglichen, die zwischen 1997 und 2015 chirurgisch reseziert und am Institut für Pathologie der Paracelsus Medizinischen Universität Salzburg, Österreich, archiviert wurden. Allerdings differenzierten Klieser et al. nicht zwischen zytoplasmatischem und nukleärem HDAC9 und die Studie bezog sich ausschließlich auf neuroendokrine Tumoren des Pankreas (pNET). Klieser et al. stellten in ihrer Arbeit eine signifikante Assoziation zwischen der Hochregulation einzelner HDACs und Eigenschaften der Tumorpheriferation sowie dem klinischen Outcome dar [71]. Eine Limitation dieser Studie war allerdings eine geringe Anzahl von 57 Patienten.

In unserer Studie wurde erstmals die Expression von HDAC5 und -9 in Primärtumoren, Lymphnoten- und Fernmetastasen in GEP-NEN untersucht.

Der erste Befund unserer Studie war eine hochsignifikant erhöhte Expression zwischen Primärtumor, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen im Vergleich zu Normalgewebe für fast alle HDAC-Varianten mit Ausnahme von nukleärem HDAC5. Die Expression von nukleärem HDAC5 unterschied sich nur signifikant zwischen Primärtumor und Normalgewebe, nicht aber zwischen Lymphknotenmetastasen und Normalgewebe sowie Fernmetastasen und Normalgewebe. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Klieser et al. überein, die eine erhöhte Expression von HDAC5 und -9 in pNET festgestellt haben [71].

In Analogie zu unseren Ergebnissen beobachteten Milde et al. einen ähnlichen Trend hinsichtlich der erhöhten Expression sowohl von HDAC5 als auch von HDAC9 in einer

anderen Tumorentität, dem Medulloblastom. Die Studie von Milde et al. zeigte, dass eine hohe Expression von HDAC 5 und -9 mit einer schlechteren Prognose und mit einem schlechteren Überleben assoziiert ist. Zusätzlich wurde eine funktionelle Analyse durch Small Interfering RNA (siRNA)-vermittelten Knockdown der beiden HDACs der Klasse IIa (HDAC 5 und -9) durchgeführt, um die Rolle der beiden HDACs zu untersuchen. Es wurde eine Reduktion des Zellwachstums und der Lebensfähigkeit von Medulloblastomzellen in vitro beobachtet, die mit der Induktion von Apoptose einherging. Milde et al. stellten daher HDAC5 und -9 als wertvolle Prognosemarker für die Risikostratifizierung und als potentielle neue Targets für die medikamentöse Therapie vor [47].

Die Rolle von HDAC5 als Schlüsselregulator in der Karzinogenese wird durch unsere Ergebnisse einer erhöhten HDAC5-Expression in GEP-NEN unterstützt [92]. Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass HDAC5 während der Myoblastendifferenzierung vom Zellkern ins Zytoplasma transloziert und die Expression des Zellzyklusaktivators Cyclin D3 unterdrückt, was seine Beteiligung an der Zelldifferenzierung und -proliferation bestätigt [93], [94]. He et al. untersuchten die Expression von HDAC5 in Darmkrebszellen und stellten fest, dass die HDAC5-Expression auf mRNA- und Proteinebene signifikant erhöht war. Darüber hinaus förderte die verstärkte Expression von HDAC5 in Darmkrebszellen die Proliferationsrate erheblich, während das Wachstum der Krebszellen durch HDAC5-Knockdown unterdrückt wurde [95]. Eine andere Studie ergab, dass HDAC 5 in Osteosarkomgeweben und -zelllinien verstärkt exprimiert wird. HDAC 5 fördert die Progression des Osteosarkoms, indem es die Expression von Twist 1 hochreguliert [96]. In Gliomzellen fördert HDAC5 die Proliferation von Gliomzellen durch Hochregulierung der Notch-1-Expression, was neue therapeutische Ansatzpunkte für die Behandlung von Gliomen bieten könnte [97]. Die oben genannten Ergebnisse bestätigen die entscheidende Rolle von HDAC5 bei der Karzinogenese.

Unsere Ergebnisse zeigten eine signifikant erhöhte HDAC9-Expression zwischen Primärtumor, Lymphknotenmetastase und Fernmetastase im Vergleich mit Normalgewebe. Die Beteiligung von HDAC9 an der Krebsentstehung wurde bereits in frühen Studien beobachtet. Die Auswirkungen und Mechanismen von HDAC9 auf zellulärer Ebene bei der Krebsentstehung werden jedoch noch kontrovers diskutiert.

Das humane HDAC9-Gen befindet sich auf Chromosom 7p21, einer Region, die bei verschiedenen malignen Erkrankungen eine Rolle spielt, darunter Darmkrebs, akute

lymphatische Leukämie im Kindesalter, Tumoren der peripheren Nervenscheide und gynäkologische Tumoren [61], [98]–[101]. Über eine abweichende Expression von HDAC9 im Rahmen von Tumorerkrankungen wurde berichtet und es besteht der Verdacht, dass HDAC 9 eine Rolle bei der Karzinogenese beim Menschen spielen könnte. Bei einigen Tumoren wie der lymphatischen Leukämie und dem Medulloblastom ist eine höhere Expression von HDAC9 mit einem schlechteren Outcome assoziiert [47], [99]. Huang et al. wiesen eine signifikant erhöhte Expression von HDAC9 sowohl im Brustkrebsgewebe als auch in den Brustkrebszellen im Vergleich zur normalen Kontrolle nach. Es wurde festgestellt, dass eine HDAC9-Überexpression positiv mit Lymphknotenmetastasen und dem TNM-Stadium korreliert. Patienten mit hoher HDAC9-Expression zeigten ein schlechteres Gesamtüberleben als Patienten mit niedriger HDAC9-Expression. Eine erhöhte HDAC9-Expression erwies sich als unabhängiger prognostischer Faktor für die Patienten. Zellexperimente haben gezeigt, dass durch einen HDAC9-Knockdown die Proliferation, Migration und Invasion von Tumorzellen unterdrückt werden kann. Die Ergebnisse von Huang et al. lassen darauf schließen, dass eine erhöhte HDAC9-Expression als prädiktiver Biomarker fungieren kann und möglicherweise an der Progression von Brustkrebs beteiligt ist [50]. Im Gegensatz dazu wurde kürzlich eine negative Korrelation zwischen der Expression von HDAC9 und dem Tumorwachstum bei Gliomen beobachtet. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression von HDAC9 die Malignitätsaktivität von Glioblastom reduzierte [102]. Die negative Korrelation zwischen der Expressionsstärke von HDAC9 und pathologischen Faktoren wurde auch in der Studie von Okudela et al. gezeigt. Die Studienergebnisse zeigten eine signifikant reduzierte HDAC9-Expression in Lungenkarzinomen im Vergleich zu gesunden, nicht-tumorösen Epithelzellen. Innerhalb der histologischen Typen waren Adenokarzinome besonders betroffen. In Adenokarzinomen mit Lymphknotenmetastase war die Expression von HDAC9 ebenfalls signifikant reduziert. Die Expression von HDAC 9 führte in vitro zu einer Hemmung der Wachstumsaktivität von Lungenkarzinomzellen. Dies deutet darauf hin, dass HDAC9 ein Suppressor sein könnte und seine Herunterregulierung den Progressionsprozess bei Lungenadenokarzinomen fördern könnte [103]. Des Weiteren wurde in einer aktuellen Studie gezeigt, dass HDAC9 die transkriptionelle Aktivität des Tumorsuppressors p53 positiv reguliert. Es wird daher vermutet, dass der Verlust von HDAC9 die tumorsuppressive Funktion von p53 beeinträchtigt und unter bestimmten Bedingungen die Tumorprogression fördert [98], [104]. Diese Diskrepanz in den Auswirkungen von

HDAC9 auf die Karzinogenese lässt vermuten, dass HDAC9 in verschiedenen Tumoren eine deutlich unterschiedliche Rolle spielt [98].

Die zweite wichtige Beobachtung unserer Studie war das Fehlen der in früheren Studien beschriebenen Rangfolge der immunhistochemischen Expressionsstärke in GEP-NEN: das nukleäre HDAC5 war am stärksten, gefolgt von zytoplasmatischem HDAC5; HDAC9 war am schwächsten ausgeprägt [71]. Die Expression von HDACs in Lymphknoten- und Fernmetastasen wurde in unserer Studie erstmals untersucht. Der Vergleich der HDAC-Expression zwischen Primärtumor, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen im Vergleich zu Normalgewebe ergab signifikante Unterschiede für fast alle HDAC-Varianten mit Ausnahme des nukleären HDAC5. Die nukleäre HDAC5-Expression wies lediglich signifikante Unterschiede zwischen Primärtumor und Normalgewebe auf, nicht aber zwischen Lymphknotenmetastasen und Normalgewebe sowie Fernmetastasen und Normalgewebe. Eine positive Korrelation weder der nukleären noch der zytoplasmatischen HDAC5-Expression in Primärtumoren mit klinisch-pathologischen Faktoren konnte in unserer Studie nachgewiesen werden. Auch die in früheren Studien beobachteten signifikanten Unterschiede in der Expression von HDAC5 und -9 zwischen den T-Stadien, in der Expression von HDAC5 zwischen niedrigen G1/2- und hohen G3-Stadien sowie die Zunahme der nukleären HDAC 5-Expression von G1 zu G3 konnten in unserer Studie nicht bestätigt werden [71].

Die Diskrepanz in der Expressionsstärke von HDAC5 und -9 zwischen dieser Studie und früheren Studien, insbesondere der von Klieser et al., könnte möglicherweise aufgrund der Sensitivität der verwendeten Antikörper bedingt sein (diese Studie: abcam; Klieser et al.: Dako, Wien, Österreich). Außerdem kann die verwendete Konzentration der Antikörper bei der Färbung zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Darüber hinaus gibt es Aspekte in der Auswertung, die schwer zu objektivieren sind. So liegt z. B. die Wahl des Cut-off-Wertes im Ermessen des Testers. Die Definition einer starken oder schwachen Expression kann daher ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Die oben genannten Aspekte sind nur eine Auswahl möglicher Ursachen für Abweichungen, die sich aus der wissenschaftlichen Untersuchungsmethodik ergeben. Eine weitere Erklärung könnte in der untersuchten Tumorlokalisation liegen. Unsere Studie analysierte die Expression von HDAC5 und -9 in neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltraktes und des Pankreas, während sich die Studie von Klieser et al. auf neuroendokrine Tumoren des Pankreas beschränkte.

Der bedeutendste Unterschied zu bisherigen Studien besteht in der signifikant erhöhten Expression von nukleärem HDAC9 in GEP-NEN sowie einer positiven Korrelationsanalyse zwischen HDAC9-Expression und klinisch-pathologischen Parametern. Ein weiteres wichtiges Ergebnis ergab sich aus der Korrelation zwischen der nukleären HDAC9-Expression und dem histologischen Grading, wobei die höchsten Expressionslevel in schlecht differenzierten GEP-NEN(G3) gefunden wurden. Umgekehrt deutet eine hohe Expression von nukleärem HDAC9 wahrscheinlich auf eine schlechtere Differenzierung von GEP-NEN hin, was mit einer schlechteren Prognose verbunden sein könnte.

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, den Wert von HDAC5 und -9 als Prognosefaktor für das Überleben von Patienten mit GEP-NEN zu evaluieren. Bisher wird Chromogranin A als unspezifischer Marker im Rahmen von GEP-NEN bestimmt. Sein Einsatz ist für die Verlaufskontrolle und Nachsorge von histologisch gesicherten GEP-NEN etabliert [105]–[110]. Er ist jedoch nicht geeignet, um als prognostischer Prädiktor zu fungieren. Hintergrund dieser Analyse ist der trotz intensiver Forschung bestehende Mangel an zuverlässigen prognostischen Markern, die eine abschätzende Vorhersage über das Überleben von Patienten mit diesen Tumoren erlauben. Zahlreiche Studien haben sich bisher mit der Analyse potenzieller Tumormarker befasst, insbesondere mit dem neuroendokrinen Neoplasmentest (NETest) [111]–[114]. Die Zuverlässigkeit solcher Marker ist jedoch umstritten.

Um die prognostische Relevanz der HDAC-Varianten in unserem GEP-NEN-Patientenkollektiv zu analysieren, führten wir eine detaillierte Überlebensanalyse durch. In der univariaten Analyse korrelierten eine hohe HDAC 9-Expression, ein hohes Alter, der Lymphknotenstatus pN+ der Patienten, das proliferationsbasierte Grading G3 sowie die Tumorlokalisierung vor allem in Kolon und Magen negativ mit dem Gesamtüberleben. In der multivariaten Analyse blieb dieser Zusammenhang mit der HDAC 9-Expression, dem Alter und dem Lymphknotenstatus erhalten. Erstmals konnte gezeigt werden, dass die Expression von HDAC 9 mit einem schlechteren Gesamtüberleben korreliert. Die von Klieser et al. beobachtete signifikante Korrelation zwischen der Expression von HDAC5 und dem Gesamtüberleben konnte in unserer Studie nicht nachgewiesen werden. Unsere Ergebnisse stehen der Beobachtung von Klieser et al. entgegen, dass eine höhere Expression von HDAC9 mit einem günstigeren Überleben assoziiert sei, während HDAC5 als stärkster Faktor das Überleben negativ beeinflusse [71].

Der Überlebensnachteil des höheren Alters könnte als allgemeines Gesundheitsrisiko interpretiert werden. Die hier beobachtete Korrelation zwischen positivem Lymphknotenstatus und kürzerem Gesamtüberleben könnte für eine Assoziation mit fortgeschrittenen Tumoren sprechen, die ohnehin mit einer schlechten Prognose assoziiert sind.

Wie bereits erwähnt, wurde in mehreren Studien eine mögliche Beteiligung von HDAC9 mit unterschiedlichen Auswirkungen auf die Karzinogenese postuliert. Die Assoziation einer erhöhten HDAC9-Expression mit einer verminderten Überlebensrate wurde z.B. beim Mammakarzinom [49]–[53], der lymphatischen Leukämie[99] und dem Medulloblastom [47] beobachtet, während die HDAC9-Expression beim Lungenkarzinom[103] als prognostisch günstiger Faktor angesehen wurde. Alle Studien stimmen jedoch darin überein, dass eine Anomalie mit sehr hoher oder sehr niedriger HDAC9-Expression die physiologische Transkriptionsregulation beeinträchtigt, was die Karzinogenese begünstigen kann [98], [104].

Die widersprüchlichen Ergebnisse, insbesondere mit Klieser et al, bei denen eine hohe Expression von HDAC9 in pNEN als günstiger Prognosefaktor für das Überleben postuliert wurde, bergen ein gewisses Konfliktpotential. Es ist darauf hinzuweisen, dass bis heute keine Metaanalyse vorliegt und es sich bei den bisher durchgeführten Einzelstudien um retrospektive Analysen einer einzelnen Institution mit einer relativ kleinen Patientenkohorte handelt, was als weniger aussagekräftig einzustufen ist. Die divergierenden Ergebnisse zeigen, dass noch viel Forschungsbedarf besteht, um das Potenzial von HDAC9 als prognostische und therapeutische Zielstruktur weiter zu erforschen, zu erweitern und entsprechend zu evaluieren.

Unser Ergebnis kann somit als Bestätigung und weiterer Ansatzpunkt für die gezielte Tumorthherapie gelten. Erst das erhöhte Auftreten eines charakteristischen Proteins im Tumorgewebe und damit dieses Proteins als Target erlaubt die gezielte Entfernung oder Beeinflussung.

In den letzten Jahrzehnten wurden dank moderner molekularer Analyseverfahren zahlreiche tumorspezifische Zellveränderungen identifiziert, die einer gezielten medikamentösen Therapie zugänglich sind. Einige dieser gezielten Therapien sind bereits in der klinischen Anwendung etabliert und verbessern die Prognose von Tumorpatienten

teilweise erheblich. Für die Behandlung von GEP-NEN stehen derzeit jedoch noch keine solchen zielgerichteten Therapiestrategien zur Verfügung.

Der größte Teil unseres bisherigen Wissens über die Wirkung von HDACi bei GEP-NEN basiert auf in vitro-Daten. Derzeit fehlt die klinische Anwendung der HDACi-basierten Mono- und Kombinationstherapie bei GEP-NEN [115]–[118]. Auf der Grundlage von In-vitro-Studien wurde sie als neue, wirksame und gut verträgliche Behandlungsstrategie diskutiert. Jin et al. führte eine Phase-II-Studie durch und untersuchten den panselektiven HDACi-Wirkstoff Panobinostat bei niedriggradigen neuroendokrinen Tumoren. Diese Phase-II-Studie ergab, dass der panselektive HDACi-Wirkstoff Panobinostat bei niedriggradigen GEP-NEN eine hohe Krankheitsstabilität und längere progressionsfreie Überlebensraten, jedoch eine niedrige Ansprechrate aufweist [119]. Baradari et al. untersuchten die antineoplastische Wirkung von drei weiteren HDACi: Trichostatin A (TSA), Natriumbutyrat (NaB) und MS-275. Es konnte gezeigt werden, dass HDACi die Proliferation von GEP-NEN-Zellen in vitro effektiv hemmen und dadurch sowohl Apoptose als auch eine Blockade des Zellzyklus in GEP-NEN induzieren [115]. Darüber hinaus wurde in dieser Studie von Baradari et al. eine Kombinationstherapie mit MS-275 und Somatostatin oder dem synthetischen Somatostatin-Analogen Octreotid evaluiert. Eine Potenzierung der antiproliferativen Wirkung durch Kombinationstherapie von Somatostatin oder Octreotid mit HDACi MS-275 wurde nicht beobachtet [115], [120]. Die Kombination von MS-275 mit Octreotid könnte jedoch einen möglichen Ansatz zur Behandlung von GEP-NEN darstellen, da durch die starke antiproliferative Wirkung von MS-275 eine Kontrolle des Tumorwachstums erreicht werden kann, während gleichzeitig Hypersekretionssyndrome durch den Einsatz von Somatostatinanaloga unterdrückt werden [115]. Es sollte jedoch beachtet werden, dass die derzeit klinisch getesteten Substanzen überwiegend sogenannte Pan-HDACi sind, die im Wesentlichen alle oder beinahe alle HDACs hemmen [115], [116], [119], [121]. Eine unspezifische Hemmung mehrerer HDACs im Gegensatz zur gezielten Blockade einzelner spezifischer HDACs könnte zu klassenspezifischen Nebenwirkungen von Pan-HDACis führen, was die Notwendigkeit einer selektiven Inhibitorentwicklung unterstreicht [122]. Die Funktionen der einzelnen HDAC-Isoformen, insbesondere HDAC 9 bei GEP-NEN sind noch unzureichend erforscht. Um die bisher verfügbaren HDACi weiterzuentwickeln, werden zunehmend neue Substanzen untersucht, die gezielt einzelne HDAC-Enzyme hemmen.

Der Einsatz von selektiven HDACis zur spezifischen Tumorthherapie bestimmter Tumorentitäten, die auf die Behandlung ansprechen, könnte die Prognose der Patienten und die Wirksamkeit der Therapie insgesamt verbessern, indem mögliche Nebenwirkungen begrenzt und deutlich reduziert werden. Je nach Tumorentitäten unterscheiden sich die Expressionsprofile der HDACs und ihre Funktion als Onkogen. Dies erschwert eine allgemeine Hypothese und erfordert wahrscheinlich in jedem klinischen Fall eine in-situ Analyse des HDAC-Profiles. Daher müssen für jede maligne Erkrankung spezifische HDACis auf ihre Wirksamkeit getestet werden, um ihre mögliche klinische Wirksamkeit abschätzen zu können [121]. Eine kürzlich publizierte Zusammenstellung der veröffentlichten Daten deutet darauf hin, dass HDACi die Wirksamkeit von Standard-Chemotherapie in einer Kombinationsbehandlung für GEP-NEN verbessern kann [123], [124]. In einer Phase-II-Studie von Bitzer et al. konnte bei Patienten mit fortgeschrittenem hepatozellulärem Karzinom(HCC) gezeigt werden, dass eine Resistenz gegen Sorafenib durch die zusätzliche Gabe des HDACi Resminostat durchbrochen werden kann, d.h. eine Therapieresistenz könnte durch den Einsatz eines HDACi überwunden werden[125].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Hemmung der HDAC-Expression das Ansprechen auf konservative Therapien wie Radio- und Chemotherapie verbessern könnte. Der Einsatz von HDACi als multimodale Therapie spricht für einen vielversprechenden Ansatz zur Verbesserung der Prognose von Patienten mit GEP-NEN. HDAC9 könnte ein wichtiges therapeutisches Ziel im Rahmen einer solchen Therapie sein. Ob ein HDAC9-Inhibitor einzeln oder als Kombinationstherapeutikum mit gängigen Chemotherapeutika zur Behandlung von GEP-NEN zukünftig klinische Bedeutung erlangt, kann bisher noch nicht abschließend beurteilt werden. Weitere Studien sind erforderlich um den Einfluss von HDAC9 auf die Karzinogenese auch bei GEP-NEN genauer zu untersuchen. Hier bieten sich vielversprechende wissenschaftliche Ansatzpunkte.

Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von HDAC5 und -9 in Gewebeproben von 78 Patienten mit GEP-NEN immunhistochemisch untersucht. Die Expression wurde quantitativ kategorisiert und mit klinisch-pathologischen Parametern und dem Überleben korreliert.

Eine Überexpression von HDAC5 und -9 im Tumorgewebe von GEP-NEN wurde bereits in früheren Studien postuliert. Dabei handelte es sich jedoch überwiegend um Einzelpublikationen einer Institution mit relativ kleinen Patientenkohorten oder sie bezogen sich meist ausschließlich auf neuroendokrine Tumoren des Pankreas (pNET).

Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen konnten wir zeigen, dass in Gewebeproben von Patienten mit GEP-NEN vor allem das zytoplasmatische HDAC5 und das nukleäre HDAC9 hochreguliert sind.

In der Analyse mit klinisch-pathologischen Parametern zeigten sich sowohl für nukleäre als auch zytoplasmatische HDAC9 signifikante Unterschiede zwischen G1 und G2 im Vergleich zu G3, wobei die höchste Expression im schlecht differenzierten GEP-NEN (G3) beobachtet wurde.

Die Expression von HDAC5 und -9 in allen Gewebeproben wurde in die Überlebenszeitanalyse einbezogen. Die stärkste negative Korrelation ergab sich zwischen nukleärem HDAC9 und dem Überleben.

Unabhängige Prognosefaktoren für das kumulative Überleben waren in der univariaten Analyse die Expressionsstärke von nukleärem HDAC9, das Alter der Patienten, der Lymphknotenstatus, das proliferationsbasierte Grading und die Lokalisation des Tumors, insbesondere in Kolon und Magen. In der multivariaten Analyse konnten die Expressionsstärke von nukleärem HDAC9, das Alter der Patienten und der Lymphknotenstatus als Einflussfaktoren identifiziert werden.

Zusammenfassend zeigt unsere Studie, dass nukleäres HDAC9 in GEP-NEN im Vergleich zu Kontrollgewebe hochreguliert ist, am stärksten mit klinisch-pathologischen Parametern assoziiert ist und mit einem kürzeren Überleben einhergeht. Zum ersten Mal liefern wir Hinweise, dass nukleäres HDAC9 ein signifikanter Prädiktor für ein ungünstiges Überleben ist, was es zu einem interessanten prognostischen Faktor und Ziel für funktionelle und therapeutische Studien macht. Einige unserer Ergebnisse

widersprechen früheren Beobachtungen aus anderen Studien. Die divergierenden Ergebnisse zeigen, dass noch viel Forschung nötig ist, um das Potenzial von HDAC9 als therapeutisches Ziel weiter zu erforschen.

Literaturverzeichnis

- [1] K. Luley *u. a.*, „Gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien – Heterogenität, Management und Perspektiven der Versorgung und Forschung“, *Internist*, Bd. 61, Nr. 8, S. 875–890, Aug. 2020, doi: 10.1007/s00108-020-00832-x.
- [2] R. V. Lloyd, R. Y. Osamura, G. Kloppel, und J. Rosai, *WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs: WHO Classification of Tumours*. International Agency for Research on Cancer: Lyon, French, 2017.
- [3] I. D. Nagtegaal *u. a.*, „The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system“, *Histopathology*, Bd. 76, Nr. 2, S. 182–188, Jan. 2020, doi: 10.1111/his.13975.
- [4] S. Yachida *u. a.*, „Small Cell and Large Cell Neuroendocrine Carcinomas of the Pancreas Are Genetically Similar and Distinct from Well-differentiated Pancreatic Neuroendocrine Tumors“, *Am J Surg Pathol*, Bd. 36, Nr. 2, S. 173–184, Feb. 2012, doi: 10.1097/PAS.0b013e3182417d36.
- [5] K. Laubner, V. Brass, W. Weber, und J. Seufert, „Aktuelle Diagnostik und Therapie von gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren (GEP-NET)“, *Onkologe*, Bd. 19, Nr. 3, S. 218–223, März 2013, doi: 10.1007/s00761-012-2393-9.
- [6] H. Scherübl *u. a.*, „Clinically detected gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors are on the rise: Epidemiological changes in Germany“, *World J Gastroenterol*, Bd. 19, Nr. 47, S. 9012–9019, Dez. 2013, doi: 10.3748/wjg.v19.i47.9012.
- [7] U. Berndt, „Neuroendokrine Tumoren: Epidemiologie und Analyse prognostischer Faktoren an 399 Patienten-Die Berlin-Erfahrung“, 2007.
- [8] D. Man, J. Wu, Z. Shen, und X. Zhu, „Prognosis of patients with neuroendocrine tumor: a SEER database analysis“, *Cancer Manag Res*, Bd. 10, S. 5629–5638, Nov. 2018, doi: 10.2147/CMAR.S174907.
- [9] C. Capella, P. U. Heitz, H. Höfler, E. Solcia, und G. Klöppel, „Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut“, *Vichows Archiv A Pathol Anat*, Bd. 425, Nr. 6, S. 547–560, Jan. 1995, doi: 10.1007/BF00199342.
- [10] H. Sorbye *u. a.*, „Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study“, *Annals of oncology*, Bd. 24, Nr. 1, S. 152–160, 2013.

- [11] K. Kraywinkel, „Epidemiologie ausgewählter endokriner Tumoren in Deutschland“, *Der Onkologe*, Bd. 24, Nr. 2, S. 99–106, 2018.
- [12] A. Rinke, „Übersicht–Ätiologie und Epidemiologie neuroendokriner Tumoren“, *TumorDiagnostik & Therapie*, Bd. 33, Nr. 04, S. 193–198, 2012.
- [13] C. Ro, W. Chai, V. E. Yu, und R. Yu, „Pancreatic neuroendocrine tumors: biology, diagnosis, and treatment“, *Chin J Cancer*, Bd. 32, Nr. 6, S. 312–324, Juni 2013, doi: 10.5732/cjc.012.10295.
- [14] G. Klöppel, M. Anlauf, und J. Lüttges, „Klassifikation und Pathologie der neuroendokrinen Tumoren des Magen-Darm-Trakts und Pankreas“, *Onkologe*, Bd. 10, Nr. 6, S. 570–579, Juni 2004, doi: 10.1007/s00761-004-0718-z.
- [15] G. Klöppel, „Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltrakts“, *Der Pathologe*, Bd. 24, Nr. 4, S. 287–296, 2003.
- [16] M. Chen, M. Van Ness, Y. Guo, und J. Gregg, „Molecular pathology of pancreatic neuroendocrine tumors“, *J Gastrointest Oncol*, Bd. 3, Nr. 3, S. 182–188, Sep. 2012, doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2012.018.
- [17] J. Choe *u. a.*, „What Is New in the 2017 World Health Organization Classification and 8th American Joint Committee on Cancer Staging System for Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms?“, *Korean Journal of Radiology*, Bd. 20, Nr. 1, S. 5–17, Jan. 2019, doi: 10.3348/kjr.2018.0040.
- [18] C. Wittekind, *TNM: Klassifikation maligner Tumoren*. John Wiley & Sons, 2016.
- [19] M. Anlauf *u. a.*, „Pathologie neuroendokriner Neoplasien“, *Der Chirurg*, Bd. 82, Nr. 7, S. 567–573, 2011.
- [20] R. Arnold, T. Badihian, S. Krusche, und G. Brabant, „Neuroendokrine Tumoren“, *Der Onkologe*, Bd. 10, Nr. 6, S. 560–569, 2004.
- [21] A. Perren *u. a.*, „ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Pathology - Diagnosis and Prognostic Stratification“, *NEN*, Bd. 105, Nr. 3, S. 196–200, 2017, doi: 10.1159/000457956.
- [22] A. Perren, A. Schmitt, P. Komminoth, M. Anlauf, und G. Klöppel, „Klassifikation und Pathologie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Tumoren“, *Viszeralmedizin*, Bd. 26, Nr. 4, S. 234–240, 2010, doi: 10.1159/000322316.

- [23] R. Arnold *u. a.*, „Endokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems“, in *Praxis der Viszeralchirurgie: Endokrine Chirurgie*, J. R. Siewert, M. Rothmund, und V. Schumpelick, Hrsg., Berlin, Heidelberg: Springer, 2013, S. 497–628. doi: 10.1007/978-3-642-14285-7_5.
- [24] C. Fottner, M. Ferrata, und M. M. Weber, „Hormone secreting gastro-entero-pancreatic neuroendocrine neoplasias (GEP-NEN): When to consider, how to diagnose?“, *Rev Endocr Metab Disord*, Bd. 18, Nr. 4, S. 393–410, Dez. 2017, doi: 10.1007/s11154-017-9438-8.
- [25] K. Holzer, „Gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumoren“, *Der Chirurg*, Bd. 85, Nr. 8, S. 731–744, 2014.
- [26] T. Baumann, C. Rottenburger, G. Nicolas, und D. Wild, „Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours (GEP-NET)–imaging and staging“, *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, Bd. 30, Nr. 1, S. 45–57, 2016.
- [27] I. Buchmann *u. a.*, „Comparison of 68Ga-DOTATOC PET and 111In-DTPAOC (Octreoscan) SPECT in patients with neuroendocrine tumours“, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, Bd. 34, Nr. 10, S. 1617–1626, Okt. 2007, doi: 10.1007/s00259-007-0450-1.
- [28] M. Gabriel *u. a.*, „68Ga-DOTA-Tyr3-octreotide PET in neuroendocrine tumors: comparison with somatostatin receptor scintigraphy and CT“, *J Nucl Med*, Bd. 48, Nr. 4, S. 508–518, Apr. 2007, doi: 10.2967/jnumed.106.035667.
- [29] J. Kunikowska, V. Lewington, und L. Krolicki, „Optimizing Somatostatin Receptor Imaging in Patients With Neuroendocrine Tumors: The Impact of 99mTc-HYNICTOC SPECT/SPECT/CT Versus 68Ga-DOTATATE PET/CT Upon Clinical Management“, *Clin Nucl Med*, Bd. 42, Nr. 12, S. 905–911, Dez. 2017, doi: 10.1097/RLU.0000000000001877.
- [30] C. Spitzweg und B. Göke, „Therapie endokriner gastrointestinaler Tumoren“, *Internist*, Bd. 43, Nr. 2, S. 219–229, Feb. 2002, doi: 10.1007/s00108-001-0510-8.
- [31] C. P. Kaudel, F. M. Watzka, und T. J. Musholt, „Chirurgische Therapie gastroenteropankreatischer neuroendokriner Neoplasien“, *Onkologe*, Bd. 17, Nr. 7, S. 609–620, Juli 2011, doi: 10.1007/s00761-011-2054-4.
- [32] C. Fottner und M. M. Weber, „Medikamentöse Therapie neuroendokriner Neoplasien des Gastrointestinaltrakts“, *Onkologe*, Bd. 24, Nr. 2, S. 124–132, Feb. 2018,

doi: 10.1007/s00761-017-0310-y.

- [33] C. J. Auernhammer, K. W. Jauch, und J. N. Hoffmann, „[Liver metastases from neuroendocrine tumours of the gastroenteropancreatic system--therapeutic strategies]“, *Zentralbl Chir*, Bd. 134, Nr. 5, S. 410–417, Sep. 2009, doi: 10.1055/s-0029-1224607.
- [34] T. Steinmüller *u. a.*, „Consensus guidelines for the management of patients with liver metastases from digestive (neuro)endocrine tumors: foregut, midgut, hindgut, and unknown primary“, *Neuroendocrinology*, Bd. 87, Nr. 1, S. 47–62, 2008, doi: 10.1159/000111037.
- [35] F. Barbieri *u. a.*, „Neuroendocrine tumors: insights into innovative therapeutic options and rational development of targeted therapies“, *Drug Discovery Today*, Bd. 19, Nr. 4, S. 458–468, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.drudis.2013.10.015.
- [36] M. Pavel *u. a.*, „ENETS consensus guidelines for the standards of care in neuroendocrine neoplasms: systemic therapy-biotherapy and novel targeted agents“, *Neuroendocrinology*, Bd. 105, Nr. 3, S. 266–280, 2017.
- [37] J. Arnemann, „Histon-Deacetylase“, in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*, A. M. Gressner und T. Arndt, Hrsg., in Springer Reference Medizin. , Berlin, Heidelberg: Springer, 2019, S. 1121–1122. doi: 10.1007/978-3-662-48986-4_3623.
- [38] P. A. Marks, T. Miller, und V. M. Richon, „Histone deacetylases“, *Current Opinion in Pharmacology*, Bd. 3, Nr. 4, S. 344–351, Aug. 2003, doi: 10.1016/S1471-4892(03)00084-5.
- [39] C. H. Arrowsmith, C. Bountra, P. V. Fish, K. Lee, und M. Schapira, „Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery“, *Nat Rev Drug Discov*, Bd. 11, Nr. 5, Art. Nr. 5, Mai 2012, doi: 10.1038/nrd3674.
- [40] J. Fan *u. a.*, „Down-regulation of HDAC5 inhibits growth of human hepatocellular carcinoma by induction of apoptosis and cell cycle arrest“, *Tumor Biol.*, Bd. 35, Nr. 11, S. 11523–11532, Nov. 2014, doi: 10.1007/s13277-014-2358-2.
- [41] E. Hendrick *u. a.*, „Metabolic inhibitors accentuate the anti-tumoral effect of HDAC5 inhibition“, *Oncogene*, Bd. 36, Nr. 34, S. 4859–4874, 2017.
- [42] M. Parra, „Class IIa HDACs – new insights into their functions in physiology and pathology“, *The FEBS Journal*, Bd. 282, Nr. 9, S. 1736–1744, 2015, doi:

10.1111/febs.13061.

[43] T.-H. Hsieh *u. a.*, „HDAC inhibitors target HDAC5, upregulate microRNA-125a-5p, and induce apoptosis in breast cancer cells“, *Molecular Therapy*, Bd. 23, Nr. 4, S. 656–666, 2015.

[44] A. Li *u. a.*, „HDAC5, a potential therapeutic target and prognostic biomarker, promotes proliferation, invasion and migration in human breast cancer“, *Oncotarget*, Bd. 7, Nr. 25, S. 37966–37978, Juni 2016, doi: 10.18632/oncotarget.9274.

[45] C. Yang, S. Croteau, und P. Hardy, „Histone deacetylase (HDAC) 9: versatile biological functions and emerging roles in human cancer“, *Cell Oncol.*, Bd. 44, Nr. 5, S. 997–1017, Okt. 2021, doi: 10.1007/s13402-021-00626-9.

[46] R. Yang *u. a.*, „HDAC9 promotes glioblastoma growth via TAZ-mediated EGFR pathway activation“, *Oncotarget*, Bd. 6, Nr. 10, S. 7644–7656, Apr. 2015, doi: 10.18632/oncotarget.3223.

[47] T. Milde *u. a.*, „HDAC5 and HDAC9 in medulloblastoma: novel markers for risk stratification and role in tumor cell growth“, *Clin Cancer Res*, Bd. 16, Nr. 12, S. 3240–3252, Juni 2010, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0395.

[48] A. Bera *u. a.*, „Proteomic Analysis of Inflammatory Biomarkers Associated With Breast Cancer Recurrence“, *Mil Med*, Bd. 185, Nr. Suppl 1, S. 669–675, Jan. 2020, doi: 10.1093/milmed/usz254.

[49] E. Salgado, X. Bian, A. Feng, H. Shim, und Z. Liang, „HDAC9 overexpression confers invasive and angiogenic potential to triple negative breast cancer cells via modulating microRNA-206“, *Biochem Biophys Res Commun*, Bd. 503, Nr. 2, S. 1087–1091, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.120.

[50] Y. Huang, W. Jian, J. Zhao, und G. Wang, „Overexpression of HDAC9 is associated with poor prognosis and tumor progression of breast cancer in Chinese females“, *Onco Targets Ther*, Bd. 11, S. 2177–2184, 2018, doi: 10.2147/OTT.S164583.

[51] M. Lapierre *u. a.*, „Histone deacetylase 9 regulates breast cancer cell proliferation and the response to histone deacetylase inhibitors“, *Oncotarget*, Bd. 7, Nr. 15, S. 19693–19708, Apr. 2016, doi: 10.18632/oncotarget.7564.

[52] B. Lian *u. a.*, „Truncated HDAC9 identified by integrated genome-wide screen as the key modulator for paclitaxel resistance in triple-negative breast cancer“, *Theranostics*,

Bd. 10, Nr. 24, S. 11092–11109, 2020, doi: 10.7150/thno.44997.

[53] A. Linares *u. a.*, „Increased expression of the HDAC9 gene is associated with antiestrogen resistance of breast cancers“, *Mol Oncol*, Bd. 13, Nr. 7, S. 1534–1547, Juli 2019, doi: 10.1002/1878-0261.12505.

[54] K. Freese *u. a.*, „Histone Deacetylase Expressions in Hepatocellular Carcinoma and Functional Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on Liver Cancer Cells In Vitro“, *Cancers*, Bd. 11, Nr. 10, Art. Nr. 10, Okt. 2019, doi: 10.3390/cancers11101587.

[55] Y. Hu *u. a.*, „Clinical significance of HDAC9 in hepatocellular carcinoma“, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, Bd. 65, Nr. 4, S. 23–28, Apr. 2019.

[56] Y. Zheng *u. a.*, „MiR-376a and histone deacetylation 9 form a regulatory circuitry in hepatocellular carcinoma“, *Cell Physiol Biochem*, Bd. 35, Nr. 2, S. 729–739, 2015, doi: 10.1159/000369733.

[57] K. Kanki, R. Watanabe, L. Nguyen Thai, C.-H. Zhao, und K. Naito, „HDAC9 Is Preferentially Expressed in Dedifferentiated Hepatocellular Carcinoma Cells and Is Involved in an Anchorage-Independent Growth“, *Cancers (Basel)*, Bd. 12, Nr. 10, S. 2734, Sep. 2020, doi: 10.3390/cancers12102734.

[58] R. Liang *u. a.*, „Mechanism and Molecular Network of RBM8A-Mediated Regulation of Oxaliplatin Resistance in Hepatocellular Carcinoma“, *Front Oncol*, Bd. 10, S. 585452, 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.585452.

[59] H. Li, X. Li, H. Lin, und J. Gong, „High HDAC9 is associated with poor prognosis and promotes malignant progression in pancreatic ductal adenocarcinoma“, *Mol Med Rep*, Bd. 21, Nr. 2, S. 822–832, Feb. 2020, doi: 10.3892/mmr.2019.10869.

[60] Y.-X. Zhao, Y.-S. Wang, Q.-Q. Cai, J.-Q. Wang, und W.-T. Yao, „Up-regulation of HDAC9 promotes cell proliferation through suppressing p53 transcription in osteosarcoma“, *Int J Clin Exp Med*, Bd. 8, Nr. 7, S. 11818–11823, 2015.

[61] D. A. Moreno *u. a.*, „Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia“, *Br J Haematol*, Bd. 150, Nr. 6, S. 665–673, Sep. 2010, doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08301.x.

[62] N. Vega-García *u. a.*, „Paediatric patients with acute leukaemia and KMT2A (MLL) rearrangement show a distinctive expression pattern of histone deacetylases“, *Br*

J Haematol, Bd. 182, Nr. 4, S. 542–553, Aug. 2018, doi: 10.1111/bjh.15436.

[63] C. A. Bradbury *u. a.*, „Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors“, *Leukemia*, Bd. 19, Nr. 10, S. 1751–1759, Okt. 2005, doi: 10.1038/sj.leu.2403910.

[64] Y. Guan, J. Yang, X. Liu, und L. Chu, „Long noncoding RNA CBR3 antisense RNA 1 promotes the aggressive phenotypes of non-small-cell lung cancer by sponging microRNA-509-3p and competitively upregulating HDAC9 expression“, *Oncol Rep*, Bd. 44, Nr. 4, S. 1403–1414, Okt. 2020, doi: 10.3892/or.2020.7719.

[65] Z. Ma *u. a.*, „Histone deacetylase 9 downregulation decreases tumor growth and promotes apoptosis in non-small cell lung cancer after melatonin treatment“, *Journal of Pineal Research*, Bd. 67, Nr. 2, S. e12587, 2019, doi: 10.1111/jpi.12587.

[66] L.-C. Lai *u. a.*, „SNP rs10248565 in HDAC9 as a novel genomic aberration biomarker of lung adenocarcinoma in non-smoking women“, *J Biomed Sci*, Bd. 21, S. 24, März 2014, doi: 10.1186/1423-0127-21-24.

[67] W. Wang *u. a.*, „miR-211-5p is down-regulated and a prognostic marker in bladder cancer“, *The Journal of Gene Medicine*, Bd. 22, Nr. 12, S. e3270, 2020, doi: 10.1002/jgm.3270.

[68] I. Lucca *u. a.*, „Urinary expression of genes involved in DNA methylation and histone modification for diagnosis of bladder cancer in patients with asymptomatic microscopic haematuria“, *Oncol Lett*, Bd. 18, Nr. 1, S. 57–62, Juli 2019, doi: 10.3892/ol.2019.10330.

[69] P. Bertrand, „Inside HDAC with HDAC inhibitors“, *European Journal of Medicinal Chemistry*, Bd. 45, Nr. 6, S. 2095–2116, Juni 2010, doi: 10.1016/j.ejmech.2010.02.030.

[70] F. Beuschlein und M. Reincke, „Neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems“, *Internist*, Bd. 53, Nr. 2, S. 129–130, Feb. 2012, doi: 10.1007/s00108-011-2905-5.

[71] E. Klieser *u. a.*, „Comprehensive immunohistochemical analysis of histone deacetylases in pancreatic neuroendocrine tumors: HDAC5 as a predictor of poor clinical outcome“, *Hum Pathol*, Bd. 65, S. 41–52, Juli 2017, doi: 10.1016/j.humpath.2017.02.009.

- [72] G. Klöppel, G. Rindi, A. Perren, P. Komminoth, und D. S. Klimstra, „Die TNM-Klassifikationen der NET des Gastrointestinaltrakts und des Pankreas von ENETS und UICC“, *Pathologe*, Bd. 31, Nr. 5, S. 353–354, Sep. 2010, doi: 10.1007/s00292-010-1385-z.
- [73] D. L. Rimm, R. L. Camp, L. A. Charette, D. A. Olsen, und E. Provost, „Amplification of Tissue by Construction of Tissue Microarrays“, *Experimental and Molecular Pathology*, Bd. 70, Nr. 3, S. 255–264, Juni 2001, doi: 10.1006/exmp.2001.2363.
- [74] W. Remmele und H. E. Stegner, „[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]“, *Pathologe*, Bd. 8, Nr. 3, S. 138–140, Mai 1987.
- [75] R. L. Camp, M. Dolled-Filhart, und D. L. Rimm, „X-tile: a new bio-informatics tool for biomarker assessment and outcome-based cut-point optimization“, *Clin Cancer Res*, Bd. 10, Nr. 21, S. 7252–7259, Nov. 2004, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0713.
- [76] S. van Buuren und K. Groothuis-Oudshoorn, „mice: Multivariate Imputation by Chained Equations in R“, *J. Stat. Soft.*, Bd. 45, Nr. 3, S. 1–67, Dez. 2011, doi: 10.18637/jss.v045.i03.
- [77] A. Dasari *u. a.*, „Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States“, *JAMA Oncol*, Bd. 3, Nr. 10, S. 1335–1342, Okt. 2017, doi: 10.1001/jamaoncol.2017.0589.
- [78] J. Hallet, C. H. L. Law, M. Cukier, R. Saskin, N. Liu, und S. Singh, „Exploring the rising incidence of neuroendocrine tumors: a population-based analysis of epidemiology, metastatic presentation, and outcomes“, *Cancer*, Bd. 121, Nr. 4, S. 589–597, Feb. 2015, doi: 10.1002/cncr.29099.
- [79] S. Minucci und P. G. Pelicci, „Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer“, *Nat Rev Cancer*, Bd. 6, Nr. 1, Art. Nr. 1, Jan. 2006, doi: 10.1038/nrc1779.
- [80] J. E. Bolden, M. J. Peart, und R. W. Johnstone, „Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors“, *Nat Rev Drug Discov*, Bd. 5, Nr. 9, Art. Nr. 9, Sep. 2006, doi: 10.1038/nrd2133.
- [81] B. Barneda-Zahonero und M. Parra, „Histone deacetylases and cancer“, *Mol*

Oncol, Bd. 6, Nr. 6, S. 579–589, Dez. 2012, doi: 10.1016/j.molonc.2012.07.003.

[82] D. M. Vigushin *u. a.*, „Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo“, *Clin Cancer Res*, Bd. 7, Nr. 4, S. 971–976, Apr. 2001.

[83] J. C. Byrd *u. a.*, „Depsipeptide (FR901228): a novel therapeutic agent with selective, in vitro activity against human B-cell chronic lymphocytic leukemia cells“, *Blood*, Bd. 94, Nr. 4, S. 1401–1408, Aug. 1999.

[84] R. W. Johnstone, „Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer“, *Nat Rev Drug Discov*, Bd. 1, Nr. 4, S. 287–299, Apr. 2002, doi: 10.1038/nrd772.

[85] R. R. Rosato, Z. Wang, R. V. Gopalkrishnan, P. B. Fisher, und S. Grant, „Evidence of a functional role for the cyclin-dependent kinase-inhibitor p21WAF1/CIP1/MDA6 in promoting differentiation and preventing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by sodium butyrate in human myelomonocytic leukemia cells (U937)“, *Int J Oncol*, Bd. 19, Nr. 1, S. 181–191, Juli 2001, doi: 10.3892/ijo.19.1.181.

[86] R. R. Rosato und S. Grant, „Histone Deacetylase Inhibitors in Cancer Therapy“, *Cancer Biology & Therapy*, Bd. 2, Nr. 1, S. 31–38, Jan. 2003, doi: 10.4161/cbt.190.

[87] B. S. Mann, J. R. Johnson, M. H. Cohen, R. Justice, und R. Pazdur, „FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma“, *The oncologist*, Bd. 12, Nr. 10, S. 1247–1252, 2007.

[88] R. Frye *u. a.*, „Romidepsin: a new drug for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma“, *Clin J Oncol Nurs*, Bd. 16, Nr. 2, S. 195–204, Apr. 2012, doi: 10.1188/12.CJON.195-204.

[89] P. G. Richardson *u. a.*, „Panobinostat: a novel pan-deacetylase inhibitor for the treatment of relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma“, *Expert Rev Anticancer Ther*, Bd. 15, Nr. 7, S. 737–748, 2015, doi: 10.1586/14737140.2015.1047770.

[90] J. McDermott und A. Jimeno, „Belinostat for the treatment of peripheral T-cell lymphomas“, *Drugs Today (Barc)*, Bd. 50, Nr. 5, S. 337–345, Mai 2014, doi: 10.1358/dot.2014.50.5.2138703.

[91] Y. Li und E. Seto, „HDACs and HDAC inhibitors in cancer development and therapy“, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, Bd. 6, Nr. 10, 2016.

- [92] L. Marek *u. a.*, „Histone deacetylase (HDAC) inhibitors with a novel connecting unit linker region reveal a selectivity profile for HDAC4 and HDAC5 with improved activity against chemoresistant cancer cells“, *J Med Chem*, Bd. 56, Nr. 2, S. 427–436, Jan. 2013, doi: 10.1021/jm301254q.
- [93] S. Roy, A. C. Shor, T. K. Bagui, E. Seto, und W. J. Pledger, „Histone deacetylase 5 represses the transcription of cyclin D3“, *J Cell Biochem*, Bd. 104, Nr. 6, S. 2143–2154, Aug. 2008, doi: 10.1002/jcb.21771.
- [94] T. A. McKinsey, C. L. Zhang, J. Lu, und E. N. Olson, „Signal-dependent nuclear export of a histone deacetylase regulates muscle differentiation“, *Nature*, Bd. 408, Nr. 6808, S. 106–111, Nov. 2000, doi: 10.1038/35040593.
- [95] P. He, J. Liang, T. Shao, Y. Guo, Y. Hou, und Y. Li, „HDAC5 promotes colorectal cancer cell proliferation by up-regulating DLL4 expression“, *Int J Clin Exp Med*, Bd. 8, Nr. 4, S. 6510–6516, Apr. 2015.
- [96] J. Chen *u. a.*, „HDAC5 promotes osteosarcoma progression by upregulation of Twist 1 expression“, *Tumor Biol.*, Bd. 35, Nr. 2, S. 1383–1387, Feb. 2014, doi: 10.1007/s13277-013-1189-x.
- [97] Q. Liu *u. a.*, „Histone deacetylase 5 promotes the proliferation of glioma cells by upregulation of Notch 1“, *Mol Med Rep*, Bd. 10, Nr. 4, S. 2045–2050, Okt. 2014, doi: 10.3892/mmr.2014.2395.
- [98] A. Clocchiatti, C. Florean, und C. Brancolini, „Class IIa HDACs: from important roles in differentiation to possible implications in tumourigenesis“, *J Cell Mol Med*, Bd. 15, Nr. 9, S. 1833–1846, Sep. 2011, doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01321.x.
- [99] R. Tao *u. a.*, „Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells“, *Nat Med*, Bd. 13, Nr. 11, S. 1299–1307, Nov. 2007, doi: 10.1038/nm1652.
- [100] B. E. Morrison und S. R. D’Mello, „Polydactyly in mice lacking HDAC9/HDRP“, *Exp Biol Med (Maywood)*, Bd. 233, Nr. 8, S. 980–988, Aug. 2008, doi: 10.3181/0802-RM-48.
- [101] H. Nishikawa und S. Sakaguchi, „Regulatory T cells in tumor immunity“, *Int J Cancer*, Bd. 127, Nr. 4, S. 759–767, Aug. 2010, doi: 10.1002/ijc.25429.
- [102] A. K. B. Lucio-Eterovic *u. a.*, „Differential expression of 12 histone deacetylase

(HDAC) genes in astrocytomas and normal brain tissue: class II and IV are hypoexpressed in glioblastomas“, *BMC Cancer*, Bd. 8, S. 243, Aug. 2008, doi: 10.1186/1471-2407-8-243.

[103] K. Okudela *u. a.*, „Expression of HDAC9 in lung cancer – potential role in lung carcinogenesis“, *Int J Clin Exp Pathol*, Bd. 7, Nr. 1, S. 213–220, Dez. 2013.

[104] Z. Yuan, L. Peng, R. Radhakrishnan, und E. Seto, „Histone deacetylase 9 (HDAC9) regulates the functions of the ATDC (TRIM29) protein“, *J Biol Chem*, Bd. 285, Nr. 50, S. 39329–39338, Dez. 2010, doi: 10.1074/jbc.M110.179333.

[105] K. Oberg *u. a.*, „ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: Biochemical Markers“, *Neuroendocrinology*, Bd. 105, Nr. 3, S. 201–211, Apr. 2017, doi: 10.1159/000472254.

[106] F. R. Nobels *u. a.*, „Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the alpha-subunit of glycoprotein hormones“, *J Clin Endocrinol Metab*, Bd. 82, Nr. 8, S. 2622–2628, Aug. 1997, doi: 10.1210/jcem.82.8.4145.

[107] L. Taupenot, K. L. Harper, und D. T. O’Connor, „The Chromogranin–Secretogranin Family“, *New England Journal of Medicine*, Bd. 348, Nr. 12, S. 1134–1149, März 2003, doi: 10.1056/NEJMra021405.

[108] R. E. Sobol, V. Memoli, und L. J. Deftos, „Hormone-Negative, Chromogranin a-Positive Endocrine Tumors“, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198902163200707>. Zugegriffen: 23. September 2023. [Online]. Verfügbar unter: <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM198902163200707>

[109] M. Stridsberg und E. S. Husebye, „Chromogranin A and chromogranin B are sensitive circulating markers for pheochromocytoma“, *Eur J Endocrinol*, Bd. 136, Nr. 1, S. 67–73, Jan. 1997, doi: 10.1530/eje.0.1360067.

[110] E. T. Janson *u. a.*, „Nordic guidelines 2014 for diagnosis and treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms“, *Acta Oncologica*, Bd. 53, Nr. 10, S. 1284–1297, Okt. 2014, doi: 10.3109/0284186X.2014.941999.

[111] K. Öberg *u. a.*, „A meta-analysis of the accuracy of a neuroendocrine tumor mRNA genomic biomarker (NETest) in blood“, *Annals of Oncology*, Bd. 31, Nr. 2, S. 202–212, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.annonc.2019.11.003.

- [112] G. Puliani *u. a.*, „NETest: A Systematic Review Focusing on the Prognostic and Predictive Role“, *Neuroendocrinology*, Bd. 112, Nr. 6, S. 523–536, Aug. 2021, doi: 10.1159/000518873.
- [113] A. Malczewska *u. a.*, „The clinical applications of a multigene liquid biopsy (NETest) in neuroendocrine tumors“, *Advances in Medical Sciences*, Bd. 65, Nr. 1, S. 18–29, März 2020, doi: 10.1016/j.advms.2019.10.002.
- [114] I. M. Modlin *u. a.*, „The NETest: The Clinical Utility of Multigene Blood Analysis in the Diagnosis and Management of Neuroendocrine Tumors“, *Endocrinol Metab Clin North Am*, Bd. 47, Nr. 3, S. 485–504, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.ecl.2018.05.002.
- [115] V. Baradari, A. Huether, M. Höpfner, D. Schuppan, und H. Scherübl, „Antiproliferative and proapoptotic effects of histone deacetylase inhibitors on gastrointestinal neuroendocrine tumor cells“, *Endocrine-Related Cancer*, Bd. 13, Nr. 4, S. 1237–1250, Dez. 2006, doi: 10.1677/erc.1.01249.
- [116] R. L. Schmitz *u. a.*, „Targeting HDACs in Pancreatic Neuroendocrine Tumor Models“, *Cells*, Bd. 10, Nr. 6, S. 1408, Juni 2021, doi: 10.3390/cells10061408.
- [117] E. Klieser, B. Neumayer, P. Di Fazio, C. Mayr, D. Neureiter, und T. Kiesslich, „HDACs as an emerging target in endocrine tumors: a comprehensive review“, *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*, Bd. 18, Nr. 2, S. 143–154, 2023.
- [118] E. Klieser *u. a.*, „Role of histone deacetylases in pancreas: Implications for pathogenesis and therapy“, *World journal of gastrointestinal oncology*, Bd. 7, Nr. 12, S. 473, 2015.
- [119] N. Jin *u. a.*, „A phase II trial of a histone deacetylase inhibitor panobinostat in patients with low-grade neuroendocrine tumors“, *The oncologist*, Bd. 21, Nr. 7, S. 785–786g, 2016.
- [120] G. Weckbecker, F. Raulf, L. Tolcsvai, und C. Bruns, „Potentiation of the anti-proliferative effects of anti-cancer drugs by octreotide in vitro and in vivo“, *Digestion*, Bd. 57, Nr. 1, S. 22–28, 1996.
- [121] J. Wanek *u. a.*, „Pharmacological Inhibition of Class IIA HDACs by LMK-235 in Pancreatic Neuroendocrine Tumor Cells“, *International Journal of Molecular Sciences*, Bd. 19, Nr. 10, Art. Nr. 10, Okt. 2018, doi: 10.3390/ijms19103128.
- [122] R. R. Shah, „Safety and Tolerability of Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors

in Oncology“, *Drug Saf*, Bd. 42, Nr. 2, S. 235–245, Feb. 2019, doi: 10.1007/s40264-018-0773-9.

[123] E. Klieser *u. a.*, „HDAC-Linked ‚Proliferative‘ miRNA Expression Pattern in Pancreatic Neuroendocrine Tumors“, *Int J Mol Sci*, Bd. 19, Nr. 9, S. 2781, Sep. 2018, doi: 10.3390/ijms19092781.

[124] T. Qiu *u. a.*, „Effects of treatment with histone deacetylase inhibitors in solid tumors: a review based on 30 clinical trials“, *Future Oncol*, Bd. 9, Nr. 2, S. 255–269, Feb. 2013, doi: 10.2217/fon.12.173.

[125] M. Bitzer *u. a.*, „Efficacy, safety, tolerability, and PK of the HDAC inhibitor resminostat in sorafenib-refractory hepatocellular carcinoma (HCC): Phase II SHELTER study.“, *Journal of Clinical Oncology*, Mai 2012, doi: 10.1200/jco.2012.30.15_suppl.4115.

Danksagung

Für die Möglichkeit, meine Dissertation an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf durchzuführen, danke ich Herrn Prof. Dr. med. W.T. Knoefel.

Ich bedanke mich insbesondere bei Herrn Prof. Dr. med. A. Krieg und seiner Frau Dr. med. S. Krieg für die Möglichkeit der Promotion und die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas. Ihre akademischen Ratschläge und Anregungen haben mir geholfen, den richtigen Kurs zu finden.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei PD Dr. med. L. Dizdar für seine Betreuung bedanken.

An dieser Stelle möchte ich auch Herrn Dr. med. F. Klinger als geschätzten Kollegen erwähnen, der mich mit seiner positiven Motivation und seinem Zuspruch in meiner wissenschaftlichen Arbeit unterstützt hat.

Herzlichen Dank an alle Mitglieder des chirurgischen Forschungslabors für ihre Hilfe und technische Unterstützung.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meiner Frau bedanken, die mich stets vielseitig unterstützt haben und mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.