

Aus der Abteilung Gastroenterologie und Endokrinologie
(Kommissarische Leitung: Prof. Dr. med. T. Sauerbruch)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Tumormikroenvironment in Neuroendokrinen Tumoren (NET) des
gastroenteropankreatischen Systems

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Julian Skupin

aus

Oldenburg

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. T. Sauerbruch (Betreuer)

II. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. med T. Pukrop (Korreferent)

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. H.-J. Radzun (Drittreferent)

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Dezember 2013

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	7
1.1 Klassifikation neuroendokriner Tumoren.....	7
1.2 Charakteristika der Tumoren in Abhängigkeit von der Lokalisation.....	13
1.3 Therapie.....	15
1.4 Das Konzept des Tumorstromas.....	16
1.5 Tumor und Immunsystem.....	16
1.6 Fragestellung.....	19
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Patientenkollektiv.....	20
2.2 Gruppierung der Tumoren.....	20
2.3 Anfertigung von Paraffinschnitten.....	22
2.4 Einführung in die immunhistochemische Analyse.....	22
2.5 Vorbehandlung der Präparate.....	24
2.6 Immunhistochemische Färbung.....	27
2.7 Immunfluoreszenzfärbung.....	28
2.8 Funktionelle Darstellung der untersuchten Oberflächenantigene.....	29
2.8.1 Einteilung der Oberflächenantigene.....	29
2.8.2 Tumorzellmarker.....	29
2.8.2.1 Chromogranin.....	29
2.8.2.2 CD56/NCAM („neuronal-cell-adhesion-molecule“).....	30
2.8.2.3 S100.....	30
2.8.2.4 Ki-67.....	31
2.8.3 Tumorstromamarker	31

2.8.3.1 α -SMA („alpha-smooth-muscle-actin“)	31
2.8.3.2 Desmin	31
2.8.3.3 Fascin	31
2.8.3.4 CD34	32
2.8.3.5 vWF (von-Willebrand-Faktor)	32
2.8.4 Immunzellmarker	33
2.8.4.1 Kim1p	33
2.8.4.2 CD3	33
2.8.4.3 CD68	33
2.8.4.4 CD20	33
2.8.5 Chemokinrezeptormarker	34
2.8.5.1 CCR2 (CC-Chemokin-Rezeptor 2)	34
2.9 Auswertungsmethoden	34
2.9.1 Mikroskopische und fotografische Auswertung	34
2.9.2 Computergestützte Auswertung	35
2.10 Statistik	36
3 Ergebnisse	38
3.1 Darstellung des Tumorkollektivs	38
3.1.1 Organlokalisierung, embryologischer Ursprung, WHO-Klassifikation und Grading	38
3.1.2 Größe der Tumoren	41
3.1.3 Geschlechts- und Altersverteilung	42
3.2 Histologische Darstellung der Tumoren und des Tumorstromas	45
3.2.1 Darstellung der histologischen Tumormarker	45
3.2.1.1 Chromogranin	45
3.2.1.2 CD56/NCAM	48
3.2.1.3 S100	52

3.2.2 Darstellung der histologischen Wachstumsmuster.....	55
3.2.3 Darstellung der Tumorstromamarker.....	58
3.2.3.1 Bestandteile des Tumorstromas.....	58
3.2.3.2 α -SMA	58
3.2.3.3 Desmin	62
3.2.3.4 Fascin	65
3.2.3.5 CD 34	68
3.2.3.6 vWF (von-Willebrand-Faktor).....	70
3.3 Darstellung der Immunzellen.....	70
3.3.1 Morphologische Darstellung der Immunzellen.....	70
3.3.2 Quantitative Darstellung der immunhistochemischen Analyse.....	72
3.4 Darstellung des CCR2.....	81
4 Diskussion.....	84
4.1 Fragestellung.....	84
4.2 Charakterisierung des Tumorkollektivs (Organlokalisierung, WHO-Klassifikation, Grading, TumorgroÙe, Geschlechts- und Altersverteilung)	85
4.2.1 Organlokalisierung.....	85
4.2.2 WHO-Klassifikation und Grading.....	85
4.2.3 TumorgroÙe.....	86
4.2.4 Geschlechts- und Altersverteilung.....	86
4.3 Histologische Darstellung der Tumoren und des Tumorstromas	87
4.3.1 Histologische Tumormarker.....	87
4.3.2 Histologische Wachstumsmuster.....	91
4.3.3 Struktur des Tumorstromas	91
4.4 Darstellung der Immunzellen	94

4.4.1 Morphologie und qualitative Darstellung der Immunzellen	94
4.4.2 Quantitative Darstellung der Immunzellen	97
4.5 Interaktion zwischen Tumor und Tumorstroma durch Chemokinrezeptoren.....	102
5 Ausblick.....	103
6 Zusammenfassung.....	104
6.1 Einführung.....	104
6.2 Methoden.....	105
6.3 Ergebnisse	105
7 Anhang.....	108
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	108
7.2 Tabellenverzeichnis.....	111
8 Literaturverzeichnis.....	113

1 Einleitung

1.1 Klassifikation neuroendokriner Tumoren

Neuroendokrine Tumoren (NET) des gastroenteropankreatischen Systems entstammen den Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems. Sie sind seltene Tumoren des Gastrointestinaltrakts (Klöppel et al. 2004). Aufgrund besserer diagnostischer Möglichkeiten hat sich die Prävalenz erhöht. Die durchschnittliche Inzidenz aller NET von 1993-2004 nach SEER-Daten (The National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results) lag unter der weißen Bevölkerung bei 4,4 je 100.000 Einwohner und unter der schwarzen Bevölkerung bei 6,5 je 100.000 Einwohner. Nach Daten des NRC (Norwegian Registry of Cancer) lag die Inzidenz von 1993-2004 bei 3,24 je 100.000 Einwohner (Hauso et al. 2008). Eine Schwedische Studie berichtet für alle NET des Intestinaltrakts über eine Inzidenz von 2,0 je 100.000 Einwohner für Männer und 2,4 je 100.000 Einwohner für Frauen (Hemminki und Li 2001).

Mehr als 100 Jahre ist es her, dass Siegfried Oberndorfer 1907 den Begriff: „Karzinoid“ einführte (Soga 2009). Er schrieb dem damals wenig verstandenen Tumor verschiedene Eigenschaften zu. Er sei klein und komme multizentrisch vor (Soga 2009). Der Tumor sei histologisch undifferenziert, ähnele aber einer drüsigen Neoplasie. Er zeige keine Tendenz, das umgebende Gewebe lokal zu infiltrieren. Er metastasiere nicht, und wüchse langsam ohne Anschein für einen bösartigen Verlauf (Soga 2009). Daher bezeichnete Oberndorfer diesen Tumor als „Karzinoid“. Mit dem Namen sollte der harmlose Verlauf des Tumors charakterisiert werden (Soga 2009).

Allerdings sollte Oberndorfer nicht Recht behalten. Der Tumor, den er damals beschrieben hatte, zeigte sehr wohl die Fähigkeit zu metastasieren. Dennoch sollte der Name „Karzinoid“ weiter bis in unsere heutige Zeit hinein bestehen.

Die Beurteilung der Dignität allein mit Hilfe von histologischen Kriterien ist nicht immer einfach. Die im Jahre 2000 erschienene WHO-Klassifikation, die unter anderem auf den Arbeiten von Capella beruht (Auerswald 2008), unterscheidet zunächst zwischen reinen neuroendokrinen und gemischt exokrin-endokrinen Tumoren (Klöppel et al. 2007).

Die reinen neuroendokrinen Tumoren werden weiterhin in drei bzw. vier Gruppen eingeteilt. Die Gruppe 1a bezeichnet die gut differenzierten NET mit benigner Dignität. Die Gruppe 1b beinhaltet die gut differenzierten neuroendokrinen Tumoren mit benignem oder niedriggradig malignem Verhalten. In die zweite Gruppe fallen die gut differenzierten neuroendokrinen Karzinome mit niedriggradig malignem Verhalten. Die dritte Gruppe umfasst die wenig differenzierten neuroendokrinen Karzinome mit hochgradig malignem Verhalten. Die Abschätzung des biologischen Verhaltens anhand der WHO-Klassifikation von 2000 erfordert

den Einsatz mehrerer Kriterien, die je nach Organlokalisierung gering differieren. In einer Studie über prognostische Faktoren gastroenteropankreatischer NET zeigen die klinisch-pathologischen Einteilungskriterien der WHO-Klassifikation von 2000 eine gute Korrelation mit dem klinischen Verlauf bei den Patienten (Pape et al. 2008a).

Die NET der *WHO-Gruppe 1a* des **Gastrointestinaltrakts** sind per definitionem nicht metastasierend, infiltrieren die Muscularis propria nicht, sind histologisch gut differenziert, sind gewöhnlich ≤ 1 cm groß, zeigen keine Angioinvasion, haben einen Ki-67-Index < 2 % und zeigen in der Regel kein hormonales Syndrom. Die NET der *WHO-Gruppe 1b* des Gastrointestinaltrakts weisen bei Diagnosestellung keine Metastasen auf, haben die Muscularis propria noch nicht infiltriert, sind histologisch gut differenziert, sind gewöhnlich ≤ 2 cm groß, können Angioinvasion zeigen, haben ebenfalls einen Ki-67-Index < 2 % und zeigen meist kein hormonales Syndrom. Die NET der *WHO-Gruppe 2* des Gastrointestinaltrakts können bei Diagnosestellung Metastasen aufweisen. Sie infiltrieren die Muscularis propria, sind histologisch gut differenziert, gewöhnlich > 2 cm, können Angioinvasion zeigen, haben einen Ki-67-Index > 2 % und weisen klinisch ein hormonales Syndrom auf. Die NET der *WHO-Gruppe 3* des Gastrointestinaltrakts können bei Diagnosestellung Metastasen aufweisen. Sie infiltrieren die Muscularis propria, sind histologisch wenig differenziert, gewöhnlich > 2 cm groß, zeigen Angioinvasion, haben einen Ki-67-Index > 20 % und zeigen in der Regel kein hormonales Syndrom (Klöppel et al. 2007).

Tab.1: Prognostische Kriterien für NET des Gastrointestinaltrakts nach WHO-Gruppen, entsprechend der WHO-Klassifikation von 2000 (modifiziert nach Klöppel et al. 2007, S.10)

Biologisches Verhalten	Metastasen	Invasion der Muscularis propria	Histologische Differenzierung	Tumgröße in cm	Angioinvasion	Ki-67 in %	Hormonales Tumorsyndrom
Benigne (WHO-Gruppe 1a)	-	-	Gut differenziert	≤1(a)	-	<2	-
Benigne oder niedriggradig maligne (WHO-Gruppe 1b)	-	-	Gut differenziert	≤2	-/+	<2	-
Niedriggradig maligne (WHO-Gruppe 2)	+	+(b)	Gut differenziert	>2	+	>2	+
Hochgradig maligne (WHO-Gruppe 3)	+	+	Wenig differenziert	Jede	+	>20	-

a Ausnahme: maligne duodenale Gastrinome sind gewöhnlich kleiner als 1 cm und auf die Submukosa beschränkt

b Ausnahme: benigne neuroendokrine Tumoren des Appendix infiltrieren gewöhnlich die Muscularis propria

Die NET der *WHO-Gruppe 1a* des **Pankreas** sind per definitionem nicht metastasierend, infiltrieren die umgebenden Organe (Duodenum, Magen) nicht, sind histologisch gut differenziert, sind gewöhnlich ≤1 cm groß, zeigen keine Angioinvasion, haben einen Ki-67-Index <2 % und können, wenn es sich um ein Insulinom handelt, ein hormonales Syndrom verursachen. Die NET der *WHO-Gruppe 1b* des Pankreas weisen bei Diagnosestellung keine Metastasen auf, haben die umgebenden Organe noch nicht infiltriert, sind histologisch gut differenziert, sind gewöhnlich >2 cm groß, können Angioinvasion zeigen, haben einen Ki-67-Index <2 % und können ein hormonales Syndrom zeigen, wenn es sich um ein Insulinom oder andere funktionelle Tumoren, wie z.B. Glukagonome handelt. Die NET der *WHO-Gruppe 2* des Pankreas können bei Diagnosestellung Metastasen aufweisen. Sie infiltrieren die umgebenden Organe, sind histologisch gut differenziert, sind gewöhnlich >3 cm, zeigen Angioinvasion, haben einen Ki-67-Index >2 % und zeigen ein hormonales Tumorsyndrom, wenn es sich um Insulinome oder andere funktionelle Tumoren handelt. Die NET der *WHO-Gruppe 3* des Pankreas können bei Diagnosestellung Metastasen aufweisen. Sie infiltrieren die umgebenden Organe, sind histologisch wenig differenziert, können jede Tumgröße aufweisen, zeigen Angioinvasion, haben einen Ki-67-Index >20 % und zeigen in der Regel kein hormonales Tumorsyndrom (Klöppel et al. 2007).

Eine Studie über molekulare Charakteristika gastroenteropankreatischer NET zeigt für NET des *Pankreas*, dass es sinnvoll ist, die *WHO-Gruppe 1a* (gut differenzierte NET mit benignem Verhalten) und die *WHO-Gruppe 1b* (gut differenzierte NET mit benignem oder

niedriggradig malignem Verhalten) in einer Gruppe zusammenzufassen (Duerr et al. 2008). Die NET der WHO-Gruppe 1a und 1b des Pankreas wiesen mehr molekulare Gemeinsamkeiten auf als NET der WHO-Gruppe 1b und NET der WHO-Gruppe 2 (gut differenzierte neuroendokrine Karzinome) (Duerr et al. 2008).

Tab.2: Prognostische Kriterien für NET des Pankreas nach WHO-Gruppen, entsprechend der WHO-Klassifikation von 2000 (modifiziert nach Klöppel et al. 2007, S.11)

Biologisches Verhalten	Metastasen	Invasion umgebender Organe	Histologische Differenzierung	Tumorgröße in cm	Angioinvasion	Ki-67 in %	Hormonales Tumorsyndrom
Benigne (WHO-Gruppe 1a)	-	-	Gut differenziert	≤1	-	<2	-/(a)
Benigne oder niedriggradig maligne (WHO-Gruppe 1b)	-	-	Gut differenziert	>2	-/+	<2	-/(b)
Niedriggradig maligne (WHO-Gruppe 2)	+	+	Gut differenziert	>3	+	>2	+(b)
Hochgradig maligne (WHO-Gruppe 3)	+	+	Wenig differenziert	Jede	+	>20	-

a Insulinome

b Insulinome und andere funktionelle Tumoren (z.B. Glukagonome)

Innerhalb der NET werden zwei verschiedene Typen unterschieden. Zum neuronalen Typ gehören Neuroblastome, Phäochromozytome und Paragangliome. Zum epithelialen Typ werden die NET des Vorder-, Mittel-, und Hinterdarms gezählt. Die anatomische Gliederung der epithelialen NET unterteilt die Tumoren anhand ihrer embryologischen Herkunft in drei verschiedene Gruppen. Zu den NET des Vorderdarms gehören NET des Magens, des Duodenums, des proximalen Jejunums und des Pankreas. Unter die NET des Mitteldarms fallen die Tumoren des distalen Jejunums, des Ileums, des Zökums und der Appendix (Klöppel et al. 2007). Zu den Tumoren des Hinterdarms gehören die NET des Kolons und Rektums (Klöppel et al. 2007).

Während die Tumoren des neuroendokrinen Systems vom Pathologen früher anhand der TNM-Klassifikation der Adenokarzinome des jeweiligen Organs eingeteilt worden waren, um einen Anhaltspunkt für das Malignitätspotential zu erhalten, existieren heute Richtlinien für das Staging und Grading der NET, die von der „European Neuroendocrine Tumor Society“ (ENETS) für die verschiedenen Lokalisationen auf den beiden Konsensus-Konferenzen 2005

für die NET des Vorderdarms und 2006 für die NET des Mittel- und Hinterdarms in Frascati, Rom festgelegt worden sind (Rindi et al. 2006a, 2006b). Die Ergebnisse wurden 2006 für die NET des Vorderdarms und 2007 für die NET des Mittel- und Hinterdarms publiziert (Rindi et al. 2006b, 2007). Eine Studie zeigt bereits die prognostische Relevanz der vorgeschlagenen TNM-Klassifikation für NET des Vorderdarms (Pape et al. 2008). Parallel dazu existiert ein weiteres Staging-System, das 2009 durch das „American Joint Committee on Cancer“ (AJCC), bzw. durch die „Union internationale contre le cancer“ (UICC) 2009 publiziert wurde; und das für viel Verwirrung gesorgt hat, da es mit den ENETS-Kriterien nicht identisch ist (Klöppl et al. 2010).

Das „**Grading**“ der Tumoren beruht auf der Mitoserate und dem Ki-67-Index. *G1-Tumoren* haben eine Mitoserate von <2/10 HPF („high-power-field“) und einen Ki-67-Proliferationsindex von ≤ 2 %; *G2-Tumoren* zeigen eine Mitoserate von 2-20/10 HPF und einen Ki-67-Proliferationsindex von 3-20 %; *G3-Tumoren* eine Mitoserate von >20/10 HPF und einen Ki-67-Proliferationsindex von >20 %.

Tab.3: „Grading“-System für neuroendokrine Tumoren (modifiziert nach Klöppl et al. 2007, S.13)

Grad	Mitoserate (10 HPF) (a)	Ki-67-Index in % (b)
G1	<2	≤ 2
G2	2-20	3-20
G3	>20	>20

a 10 HPF: „high power field“= 2mm², mindestens 40 Felder evaluiert, in Bereichen der höchsten mitotischen Aktivität

b MiB1-Antikörper, in % von 2000 Zellen in Bereichen mit der höchsten Kernfärbung

Ende 2010 wurde von der WHO eine neue Klassifikation für die neuroendokrinen Tumoren ausgearbeitet. Das neue Klassifikationssystem stellt eine Vereinfachung und Abwandlung des Klassifikationssystems aus dem Jahre 2000 dar. Ziele waren unter anderem, eine einheitliche Klassifikation für NET, unabhängig von deren Lokalisation, zu erzielen, und darüber hinaus die aufwendige Hybridklassifikation (siehe Tab. 1/2), die sowohl das Grading, als auch Staging-Parameter wie die Größe und Metastasierung berücksichtigt, zu verlassen (Klimstra et al. 2010). Ein Nachteil für die klinische Praxis in der Klassifikation von 2000, der mit der neuen Klassifikation entfällt, ist außerdem die Tatsache, dass NET anders gruppiert werden, falls im Verlauf Metastasen auftreten. Der Tumor bei Erstdiagnose bekommt einen anderen Namen, falls sich doch eine Metastasierung entwickelt (Klimstra et al. 2010).

Das neue Klassifikationssystem benutzt für die neuroendokrinen Tumoren den Oberbegriff „neuroendokrine Neoplasie“ (Klimstra et al. 2010, Klöppel 2011). Der Begriff neuroendokrine Neoplasie (NEN) stellt den akkurateren Begriff dar, weil man davon ausgeht, dass alle NET potentiell maligne sind (Klimstra et al. 2010, Klöppel 2011). Trotzdem genießt der Begriff neuroendokriner Tumor weitgehende Akzeptanz (Klimstra et al. 2010, Klöppel 2011) und wird auch als Oberbegriff in der Klinik weiter Verwendung finden.

Nach der neuen Klassifikation werden die Tumoren nur noch nach Differenzierung und dem Grading nach Ki-67-Index und Mitosezahl kategorisiert (siehe Tab.3). Das biologische Verhalten wird in niedriggradig maligne, intermediärgradig maligne und hochgradig maligne unterteilt (Klimstra et al. 2010). Es wird zwischen den drei verschiedenen Entitäten *neuroendokrine Neoplasie Grad 1 (NEN-G1)*, *neuroendokrine Neoplasie Grad 2 (NEN-G2)*, und *neuroendokrine Neoplasie Grad 3*, für die der Begriff *neuroendokrines Karzinom (NEC-G3)* reserviert ist, unterschieden. Die *NEN-G1* und die *NEN-G2* werden als gut differenzierte NET zusammengefasst. Davon abgegrenzt werden die wenig differenzierten *NEC-G3*. Die wenig differenzierten *NEC-G3* werden weiter in kleinzellige und großzellige *NEC-G3* eingeteilt (Klimstra et al. 2010, Klöppel 2011). Eine wenig differenzierte NEN wird automatisch als hochgradig maligner *G3-Tumor* angesehen und in die Kategorie *NEC-G3* eingeordnet (Klimstra et al. 2010). Eine Übersicht über die neue WHO-Klassifikation von 2010 ist in Tab. 4, ein Vergleich zwischen der alten und neuen Klassifikation ist in Tab. 5 dargestellt.

Tab.4 WHO-Klassifikation für gastroenteropankreatische NET von 2010 (modifiziert nach Klimstra et al. 2010, S.709)

Tumorgrad	Einteilung nach WHO-Klassifikation von 2010
Niedriggradig	Neuroendokrine Neoplasie, Grad 1 (NEN-G1)
Intermediärgradig	Neuroendokrine Neoplasie, Grad 2 (NEN-G2)
Hochgradig	Neuroendokrines Karzinom, Grad 3 (NEC-G3), Kleinzelliges Karzinom Neuroendokrines Karzinom, Grad 3 (NEC-G3), Großzelliges Karzinom

Tab.5 Vergleich der WHO-Klassifikationssysteme für gastroenteropankreatische NET von 2000 und 2010 (modifiziert nach Klöppel 2011, S.2, Klöppel et al. 2007, S.10/11)

WHO-Klassifikation für NET des gastroenteropankreatischen Systems von 2000	WHO-Klassifikation für NEN des gastroenteropankreatischen Systems von 2010
(1) Gut differenzierter neuroendokriner Tumor mit benignem oder unsicherem Verhalten (WDET)	(1) Neuroendokrine(r) Neoplasie/Tumor G1 (Karzinoid) oder G2 (NET)
(2) Gut differenziertes neuroendokrines Karzinom (WDEC)	
(3) Wenig differenziertes neuroendokrines Karzinom (PDEC)	(2) Neuroendokrines Karzinom G3, groß-zelliger oder kleinzelliger Typ (NEC)

1.2 Charakteristika der Tumoren in Abhängigkeit von der Lokalisation

NET sind wahrscheinlich die heterogenste Gruppe aller Neoplasien. Sie kommen nicht nur im gesamten Verdauungstrakt (mit Ausnahme des Ösophagus) und in der Lunge vor; ihre biologische Aggressivität, die hormonelle Aktivität, die Behandlung und die Art der klinischen Manifestation unterscheiden sich maßgeblich in Abhängigkeit von der Primärlokalisation. Im Folgenden werden die individuellen Charakteristika der neuroendokrinen Tumoren des *Dünndarms*, des *Kolorektums* und des *Pankreas* hervorgehoben.

Dünndarm

NET des Dünndarms sind submukös lokalisiert. Die bedeckende Mukosa kann ulzeriert sein. Sie können ein insuläres, trabekuläres oder azinäres Wachstumsmuster zeigen (Iacobuzio-Donahue 2005). Grundsätzlich muss man embryologisch zwischen den Tumoren des Duodenums und des Jejunums/Ileums unterscheiden. Ungefähr zwei Drittel der im Duodenum lokalisierten NET sind Gastrinome. Nur ungefähr ein Drittel der Gastrinome sind funktionell und erzeugen das Zollinger-Ellison-Syndrom. Beim Zollinger-Ellison-Syndrom kommt es durch eine Hypersekretion von Magensäure zu einer rezidivierenden peptischen Ulkuserkrankung (Hasler et al. 2005). In 50 % aller Fälle sind Gastrinome bereits bei Diagnosestellung metastasiert. Im Duodenum eher seltene, im restlichen Dünndarm sonst häufiger vertretene NET sind Somatostatinome. Ein Drittel aller Somatostatinome sind mit der Neurofibromatose Typ 1 assoziiert (Iacobuzio-Donahue 2005).

Die Tumoren des Jejunums, Ileums bzw. des Meckel'schen Divertikels zeigen häufig keine Symptome. Sie können unspezifische Beschwerden, wie abdominale Schmerzen und Obstruktion im Sinne eines Subileus zeigen. Das Karzinoid-Syndrom präsentiert sich nahezu ausschließlich nach hepatischer Metastasierung. Typischerweise können wässrige

Diarrhöen, Flush-Anfälle, Bronchokonstriktion und Rechtsherzversagen auftreten (Gustaffson et al. 2008).

Für Patienten mit einem neuroendokrinen Tumor des Dünndarms und hepatischer Metastasierung beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate in etwa 40 %, die Gesamtüberlebensrate liegt bei 64,1 % (Gustaffson et al. 2008).

Kolorektum

Die häufigste Lokalisation ist das Rektum, gefolgt vom Zökum; die Tumoren präsentieren sich als submukös gelegene Knoten, mit darüber liegender Mukosa, die ulzeriert sein kann (Iacobuzio-Donahue 2005). Kolorektale neuroendokrine Tumoren können durch rektale Blutungen, abdominale Schmerzen und Stuhlunregelmäßigkeiten auffallen; 50 % der Patienten mit rektaler Manifestation sind asymptomatisch (Gustaffson et al. 2008). Während die Tumoren des Rektums eine 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 72 % aufweisen, liegt sie bei den neuroendokrinen Tumoren des Kolons nur bei 42 % (Iacobuzio-Donahue 2005).

Pankreas

NET des Pankreas sind zu 55 % hormonell aktiv (Herold 2008). Man unterscheidet je nach Hormonproduktion *Insulinome*, *Gastrinome*, *Vipome* und *Glukagonome*. Das *Insulinom* ist im Allgemeinen klein, solitär und nur in weniger als 10 % aller Fälle maligne (Herold 2008), wobei die neue WHO-Klassifikation davon ausgeht, dass alle NET potentiell maligne sein können (Klimstra et al. 2010). Ungefähr 20 % der hormonaktiven Tumoren sind *Gastrinome*. *Vipome* und *Somatostatinome* sind sehr seltene Tumoren. *Vipome* können mit dem Verner-Morrison-Syndrom einhergehen, *Somatostatinome* mit dem Somatostatin-Syndrom (Herold 2008).

Das Verner-Morrison-Syndrom wird durch die Aktivierung der intestinalen und pankreatischen Adenylcyclase durch Vasointestinales Polypeptid (VIP) hervorgerufen. Es kommt daraufhin zu einer vermehrten Pankreas- und Dünndarmsekretion, die sich klinisch als Trias aus wässrigen Durchfällen, Hypokaliämien und Hypo-, bzw. Achlorhydrien manifestiert. Das Somatostatin-Syndrom zeichnet sich durch die Entwicklung eines Diabetes mellitus und der gehäuften Präsentation von Gallensteinen aus (Herold 2008).

Die hormoninaktiven Tumoren sind durchschnittlich etwas größer. Sie fallen durch keine klinischen Symptome auf. Sie sind häufig Zufallsbefunde in der bildgebenden Diagnostik. Die Beurteilung der Metastasierungswahrscheinlichkeit ist wie bei allen anderen neuroendokrinen Tumoren schwierig. Die Größe spielt bei den hormoninaktiven Tumoren eine entscheidende Rolle. Tumoren, die kleiner als 2 cm sind, zeigen eher benignes

Verhalten, größere Tumoren haben ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Metastasierung (Iacobuzio-Donahue 2005).

1.3 Therapie

So heterogen, wie die NET des enteropankreatischen Systems sich präsentieren, so unterschiedlich sind auch die Therapieoptionen. Die einzig kurative Therapie ist die chirurgische Resektion, die als R0-Resektion angestrebt wird (Plöckinger und Wiedenmann 2007). Die palliative Therapie richtet sich danach, ob durch exzessive Hormonproduktion Symptome wie Flush-Anfälle auftreten oder ob eine unspezifische Symptomatik wie z.B. abdominelle Beschwerden durch infiltrative Prozesse vorliegt. Die Behandlung mit Somatostatinanaloga bildet die Basis zur Kontrolle hormonabhängiger Symptome bei nicht-resektablen neuroendokrinen Karzinomen (Cameron und Ramadori 2010). Somatostatinanaloga wie Lanreotid oder Octreotid binden an Somatostatinrezeptoren, vorwiegend an sst2 und sst5, und sind in der Lage, die durch exzessive Hormonproduktion entstehenden Symptome abzuschwächen. Darüber hinaus kann das Tumorwachstum bei Patienten, die auf die Medikation ansprechen, gehemmt werden (Arnold et al. 1993, Plöckinger und Wiedenmann 2007). In einer Studie über den Einfluss von Octreotid auf NET des gastroenteropankreatischen Systems konnte eine Stabilisierung des Tumorwachstums für 18 Monate im Median nachgewiesen werden (Arnold et al. 1996).

Bei Therapieversagen mit Somatostatinanaloga können unterschiedliche Chemotherapien oder sogar Interferone als Alternative zum Einsatz kommen. Interferone können die hormonabhängigen Syndrome kontrollieren, allerdings ist ihr Nebenwirkungsspektrum größer als bei den Somatostatinanaloga (Plöckinger und Wiedenmann 2007). Zu den unterschiedlichen Chemotherapien, die bei einem Tumorprogress zur Anwendung kommen, zählen verschiedene Alkylanzien wie Oxaliplatin, Capecitabine (Bajetta et al. 2007), Dacarbazin (Mitry et al. 1999) und Etoposid (Mitry et al. 1999). Darüber hinaus komplettieren Therapien mit m-TOR-Inhibitoren bei fortgeschrittenen NET des Pankreas, die nicht auf Chemotherapie ansprechen (Yao et al. 2010) und Therapien mit dem initial beim Glioblastom eingesetzten Temozolomid (Ekeblad 2007), einer oralen Vorstufe von Dacarbazin, das überaus breite Behandlungskonzept der NET. Temozolomid kann sowohl als Monotherapie (Ekeblad 2007), als auch als Kombinationstherapie mit Capecitabine (Strosberg et al. 2011) den Tumorprogress in fortgeschrittenen NET verlangsamen.

Als zusätzliche palliative Therapieoption bei fortgeschrittenen neuroendokrinen Karzinomen werden Radioisotopen-markierte Somatostatinanaloga eingesetzt, die an die Somatostatinrezeptoren andocken und lokal β -Strahlung freisetzen. Die Verwendung von

[90Y-DOTA0Tyr3]-Octreotid oder [177Lu-DOTA0Tyr3]-Octreotat kann eine Tumorregression bewirken (Kaltsas 2005).

Neuere Therapiekonzepte wie der Einsatz von Tyrosinkinaseinhibitoren und antiangiogenetischer Therapie sind Gegenstand klinischer Studien (Plöckinger und Wiedenmann 2007). Eine neue klinische Studie zeigt eine Verlängerung des remissionsfreien Überlebens von Patienten mit fortgeschrittenen pankreatischen neuroendokrinen Tumoren, die mit Sunitinib behandelt wurden (Raymond et al. 2011). Eine Vakzinierungstherapie mit dendritischen Zellen könnte bei fortgeschrittenen neuroendokrinen Tumoren vielversprechend sein (Schott et al. 1999, Schott und Seissler 2003).

1.4 Das Konzept des Tumorstromas

Lange Zeit wurde vernachlässigt, dass Tumoren nicht nur Zellverbände aus genetisch, morphologisch und funktionell veränderten Zellen sind, sondern dass sie von einem komplexen Netzwerk aus Fibroblasten, Blutgefäßen, Immunzellen, und extrazellulärer Matrix durchzogen werden: dem Tumorstroma oder „Mikroenvironment“. Zu jeder Zeit interagieren die Tumorzellen (Whiteside 2008). Die Stromazellen unterwerfen sich entweder dem Kommando des Tumors und erwerben promaligne Eigenschaften oder sie entziehen sich dem Einfluss des Tumors und entwickeln antimaligne Verhaltensweisen (Witz 2008). Eine herausragende Rolle im Tumorstroma spielen die Immunzellen (Whiteside 2008).

1.5 Tumor und Immunsystem

In vielen unterschiedlichen Tumoren spielen Immunzellen eine entscheidende Rolle für die Tumorprogression bzw. -regression. Man geht beim Zusammenspiel von Tumor und Immunsystem heute von der sogenannten „Three E’s-Hypothese“ aus (Swann und Smyth 2007). Die drei Es stehen für die drei Phasen der Interaktion „elimination“, „equilibration“ und „escape“. Das bedeutet, dass der Tumor zunächst vom Immunsystem kontrolliert und einzelne maligne entartete Zellen erkannt bzw. zerstört werden. Wenn die Elimination allerdings nur partiell abläuft, kommt es zur zweiten Phase, in der das Immunsystem den Tumor zwar kontrollieren, ihn aber nicht vollständig zerstören kann. Es resultiert ein Equilibrium. In der dritten Phase „entkommt“ der Tumor den Abwehrfunktionen des Immunsystems. Der Tumor produziert Zytokine, die das Immunsystem inhibieren und das Wachstum des Tumors fördern können (Swann und Smyth 2007). Obwohl bekannt ist, dass Entzündungsreaktionen die Entstehung von Tumoren fördern (Balkwill und Mantovani 2001), heißt dies im Umkehrschluss nicht, dass die Immunzellen in Tumoren in ein entzündliches Milieu eingebettet sind (Cameron et al. 2008).

Im Tumorstroma können sowohl Zellen des spezifischen Immunsystems als auch Zellen des unspezifischen Immunsystems vorkommen. Während T-Lymphozyten, dendritische Zellen, Makrophagen und polymorphonukleäre Leukozyten regelmäßig vorkommen, finden sich B-Lymphozyten gelegentlich und natürliche Killerzellen eher selten (Whiteside 2008).

Zu den Tumoren, die bisher eingehender auf ihre Interaktionen mit dem Immunsystem und ihrem Stroma untersucht wurden, gehören das kolorektale Karzinom (Naito et al. 1998, Ropponen et al. 1997, Sandel et al. 2005, Suzuki et al. 2002), das Mammakarzinom (Bell et al. 1999), das Prostatakarzinom (Sfanos et al. 2009) und das maligne Melanom (Clemente et al. 1996, Hussein 2005). Dabei hat das Auftreten bestimmter Zelltypen Einfluss auf die Prognose der Patienten. Eine große Anzahl von Tumor-assoziierten Makrophagen (TAM) korreliert in der Regel mit einer schlechten Prognose (Solinas et al. 2009). So können TAM eine Reihe von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Enzymen produzieren, die das Wachstum, die Angiogenese, die Invasion und die Metastasierung von Tumoren stimulieren (Lewis und Pollard 2006). TAM entstehen aus im Blut zirkulierenden Monozyten, die von CD34-positiven Progenitorzellen aus dem Knochenmark abstammen (Lewis und Pollard 2006). Obwohl ein Großteil der TAM aus peripheren Monozyten entsteht, die von lokalen Chemokinen zum Tumorgewebe gelockt werden, gibt es Mechanismen, die eine Proliferation der TAM im Tumor selbst begünstigen (Bingle et al. 2002). Man unterscheidet darüber hinaus zwei Subpopulationen von Makrophagen, die sich in ihrem Zytokinmuster, das sie exprimieren, unterscheiden (Solinas et al. 2009). Zum einen gibt es die M2-Makrophagen, die einen großen Anteil der Makrophagen im Tumorgewebe darstellen (Sica et al. 2008). Diese Makrophagen exprimieren viel Interleukin-10 (IL-10) und wenig Interleukin-12 (IL-12) (Mantovani et al. 2004). M2-Makrophagen produzieren außerdem im Allgemeinen wenig proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Mantovani et al. 2004). Die Bezeichnungen der unterschiedlichen Makrophagenpopulationen haben ihren Ursprung darin, dass die M2-Makrophagen und ihre spezifischen Untergruppen in erster Linie eine TH2-dominierte Antwort induzieren, währenddessen die M1-Makrophagen wenig IL-10, viel IL-12 produzieren und eher eine TH-1-dominierte Antwort erzeugen (Mantovani et al. 2004). Die Differenzierung zu einem der beiden Makrophagen-Typen erfolgt durch Zytokin-Stimuli. Während Interferon- γ (INF- γ) und Lipopolysaccharid (LPS) die Polarisation zu M1-Makrophagen fördern, begünstigen Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-13 (IL-13) die Entstehung von M2a-Makrophagen, Immunkomplexe und „Toll-like-receptor“-Liganden (TLR-Liganden) die Differenzierung zu M2b-Makrophagen, und IL-10 bzw. Glukokortikoide die Reifung zu M2c-Makrophagen (Mantovani et al. 2004). Darüber hinaus unterscheiden sich die beiden Makrophagen-Populationen in ihren Aufgaben. M1-Makrophagen sind normalerweise zuständig für die Abwehr von viralen oder mikrobiellen Infektionen (Solinas et

al. 2009). Die M2-Makrophagen kommen speziell bei der Abwehr von Parasiten (Raes et al. 2007) und bei der Heilung von Wunden zum Einsatz (Solinas et al. 2009).

Außerdem spielen dendritische Zellen eine große Rolle in einer Vielzahl unterschiedlicher Tumorentitäten. Sie gelten als potente Antigen-präsentierende Zellen und sehr starke Stimulatoren von T-Zellen (Hart 1997). Dabei sind sie sehr eng mit den Makrophagen verwandt. Sie stammen sowohl von myeloiden als auch von lymphoiden Vorläuferzellen ab (Hussein 2005). Unter Einfluss von GM-CSF können CD34-positive Progenitorzellen zu dendritischen Zellen heranreifen (Caux et al. 1994). Es konnte beobachtet werden, dass die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen unter Einfluss hoher IL-10-Konzentrationen inhibiert wird (Sica et al. 2008). Darüber hinaus können noch in sehr späten Reifestadien Makrophagen in dendritische Zellen in Abhängigkeit spezifischer Zytokinsignale umgewandelt werden (Palucka et al. 1998). Die dendritischen Zellen werden weiter in reife und unreife dendritische Zellen eingeteilt. Unreife dendritische Zellen besitzen Phagozytosefähigkeit. Sie nehmen Tumorantigene auf, differenzieren sich in reife dendritische Zellen und können danach T-Lymphozyten im Lymphknoten oder in sekundären lymphatischen Geweben stimulieren (Sandel et al. 2005). Es wurde ebenfalls beobachtet, dass reife dendritische Zellen sich im Tumorstroma in sogenannten „Clustern“ anordnen und dort direkt T-Lymphozyten stimulieren können (Suzuki et al. 2002). Während unreife dendritische Zellen Oberflächenantigene wie S-100 (Sandel et al. 2005) und CD1a (Bell et al. 1999) exprimieren, benötigen reife dendritische Zellen zur Costimulation von T-Lymphozyten andere Oberflächenantigene wie CD83 und DC-LAMP (Bell et al. 1999). Der Einfluss, den dendritische Zellen auf die Prognose von Tumoren haben, ist komplex und je nach Tumorart unterschiedlich bzw. abhängig vom dominanten dendritischen Zelltyp und seiner Lokalisation. Beim malignen Melanom ist die Anzahl reifer dendritischer Zellen im Tumor, peritumoral und in der umliegenden Epidermis verringert (Hussein 2005). Darüber hinaus findet man hauptsächlich unreife dendritische Zellen in der Tumorregion, die keine effektive T-Zell-Stimulation hervorrufen (Hussein 2005). Beim kolorektalen Karzinom erwies sich die Anwesenheit von reifen dendritischen Zellen zwischen den Tumorzellen und von unreifen Zellen im Randbereich des Tumors als prognostisch ungünstig (Sandel et al. 2005). Ein Erklärungsansatz hierfür ist, dass unreife Zellen auf dem Weg zu den Tumorzellen, mit denen sie in Kontakt treten müssen, um Antigene aufzunehmen, gehemmt werden. Im Gegenzug werden reife dendritische Zellen, die bereits Tumorantigene aufgenommen haben, zwischen den Tumorzellen „gefangen“ gehalten (Sandel et al. 2005).

Die Anzahl der T-Lymphozyten korreliert in fast allen Tumoren mit der Prognose. Eine hohe Anzahl an T-Lymphozyten bedeutet in der Regel eine günstigere Prognose (Clemente et al. 1996, Naito et al. 1998, Sato et al. 2005, Zhuang et al. 2010). Eine Subpopulation der T-Zellen, die „forkhead-box-P3“(FOXP3)-exprimierenden regulatorischen T-Zellen (Tregs),

können ein ambivalentes Verhalten zeigen. Während die prozentuale Anzahl einer Untergruppe regulatorischer Zellen, z.B. beim großzelligen Bronchialkarzinom mit höherem Tumorstadium zunimmt (Ju et al. 2009), korreliert die Anzahl von FOXP3-positiven Zellen beim Kardiakarzinom mit einer besseren Prognose. Es wird argumentiert, dass Tregs vermutlich entzündliche Prozesse hemmen, die die Karzinogenese fördern (Haas et al. 2009).

Viel Aufmerksamkeit in der Erforschung des Tumorstromas haben Zytokine erlangt, die sowohl pro- als auch antimaligne Eigenschaften besitzen. Involviert in das komplexe Zusammenspiel zwischen Tumor- und Stromazellen sind Zytokine wie TNF- α , IL-1, IL-6, Makrophagen-anlockende Zytokine wie CCL-2 (CC-Chemokin-Ligand 2, entspricht MCP1, „monocyte-chemoattractant-protein“), TGF- β („tumor-growth-factor- β “) oder NF κ B („nuclear-factor- κ of activated b-cells“) (Solinas et al. 2009). Es lässt sich nicht vorhersagen, ob ein Zytokin eher promaligne oder antimaligne Eigenschaften zeigt. TGF- β zum Beispiel kann sowohl Apoptose, als auch die Metastasierung fördern (Witz 2008). Auch TNF- α und NF κ B haben pro- und antimaligne Eigenschaften (Witz 2008). Dadurch wird das Verständnis des Tumorstromas erschwert. Dennoch scheint das Tumorstroma eine überragende Rolle in der Kanzerogenese zu spielen, so dass es trotz seiner Komplexität und seiner „zweischneidigen“ Funktion (Witz 2008) in der Entwicklung neuer Therapiemodalitäten nicht ignoriert werden darf.

1.6 Fragestellung

Das Tumorstroma und die Interaktion zwischen Immunzellen und Tumor spielen in vielen Tumorentitäten eine herausragende Rolle. So zeigen andere gastrointestinale Tumoren wie das kolorektale Karzinom ein ausgeprägtes Tumorstroma mit einer Vielzahl infiltrierender Zellen (Ropponen et al. 1997, Sandel et al. 2005, Suzuki et al. 2002, Xie et al. 2006). Gastrointestinale Stromatumoren, die wie die neuroendokrinen Tumoren im Gastrointestinaltrakt submukös lokalisiert sind, zeigen ebenfalls ein eigenes Tumorstroma (Cameron et al. 2008). Das Mikroenvironment der neuroendokrinen Tumoren wurde bislang nicht untersucht. Es gibt wenige Arbeiten, die ein Auftreten von T-Zellen im Blut von Patienten mit NET des Mitteldarms zeigen (Vikman et al. 2008, 2009).

Es existiert eine Vielzahl offener Fragen zum Stroma neuroendokriner Tumoren. Die folgende Arbeit hat daher das Ziel, das Mikroenvironment humaner NET anhand immunhistochemischer Analysen zu untersuchen und so Immunzellen, die eine Rolle in der Tumorprogression spielen könnten, zu identifizieren.

In dieser Arbeit sollen folgende Fragen untersucht werden:

1. Wie ist die Verteilung der NET aus meinem Tumorkollektiv in Abhängigkeit der Organlokalisierung, der WHO-Klassifikation, des Gradings, der Größe, des Geschlechts und des Alters der Patienten?
2. Wie ist die Struktur des Tumorstromas (Tumormarker, histologische Wachstumsmuster, Tumorstromamarker) in Abhängigkeit von der Organlokalisierung und der WHO-Klassifikation?
3. Kommen Immunzellen in den NET vor und wie ist die quantitative bzw. qualitative Verteilung in Abhängigkeit von der Organlokalisierung und der WHO-Klassifikation?
4. Lässt sich CCR2 nachweisen, der die Interaktion von Tumor und Stroma beeinflusst?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv

Für die vorliegende Dissertation wurden 55 Patienten mit gastroenteropankreatischen NET aus den Jahren 1998-2008 untersucht. Die in Paraffin eingebetteten Präparate der Patienten stammen aus den Archiven der Abteilung für Pathologie des Zentrums Pathologie und Gastroenteropathologie der Medizinischen Fakultät der Universitätsmedizin Göttingen. Die Diagnose wurde anhand der Pathologiebefunde und durch mikroskopische Kontrolle der zum Tumorpräparat passenden HE-Schnitte gestellt. Ihre weitere Einteilung erfolgte in Absprache mit der Pathologie (Prof. Füzesi) anhand der in dieser Arbeit angelegten Kriterien durch mich. Die Arbeit wurde von der Ethikkommission der Universitätsmedizin Göttingen genehmigt.

2.2 Gruppierung der Tumoren

Die Gruppierung der NET erfolgte anhand der Organlokalisierung (*Dünndarm, Kolorektum, Pankreas*), der embryologischen Herkunft, d.h. ob die Tumoren dem *Vorder-, Mittel-, oder Hinterdarm* entstammen, und anhand der Prognosefaktoren zur Abschätzung des biologischen Verhaltens, basierend auf der WHO-Klassifikation von 2000 (Klöppel et al. 2007). Die Einteilung nach der embryologischen Herkunft wurde bei der Auswertung jedoch nicht berücksichtigt, da sie relativ alt ist und durchaus Zweifel bestehen, ob sie von prognostischer Relevanz ist (Klöppel et al. 2004). Die notwendigen Kriterien zur Einschätzung des biologischen Verhaltens (Metastasierung, Invasion der Muscularis propria, histologische Differenzierung, Tumorgröße, Angioinvasion) ergaben sich aus den pathologischen Befunden. Klinische Daten über hormonelle Tumorsyndrome lagen nicht vor. Der Ki-67-Proliferationsindex wurde quantifiziert, indem Fotos von der Tumorregion mit der

höchsten Ki-67-Positivität gemacht wurden und der Quotient aus der Anzahl markierter Zellen und Anzahl der Gesamtzellen bestimmt wurde (siehe Kapitel 2.9).

In der vorliegenden Arbeit wurde die WHO-Klassifikation von 2000 (nach Klöppel et al. 2007) verwendet. Bei der Einteilung der NET dieser Arbeit in die drei prognostischen Gruppen nach der WHO-Klassifikation von 2000 wurden Tumoren mit Lymphknotenmetastasierung oder Invasion der Muscularis propria in die *WHO-Gruppe 2* (gut differenzierte Tumoren mit niedriggradig malignem Verhalten = neuroendokrines Karzinom) eingeordnet, wenn der Ki-67-Proliferationsindex bei $<20\%$ lag, und in die *WHO-Gruppe 3* (wenig differenzierte Tumoren mit hochgradig malignem Verhalten = neuroendokrines Karzinom) sortiert, wenn der Ki-67-Proliferationsindex $>20\%$ war oder sich die Tumoren histologisch als wenig differenziert präsentierten. Für den *Dünndarm* und das *Kolorektum* fielen nur die NET in die *WHO-Gruppe 1* nach der WHO-Klassifikation von 2000, deren maximale Tumorgroße bei ≤ 2 cm, deren Ki-67-Proliferationsindex bei $<2\%$ lag und die anhand der pathologischen Befunde nicht in die regionären Lymphknoten oder in die Muscularis propria infiltriert waren. Für das *Pankreas* fielen nur die NET in die *WHO-Gruppe 1* nach der WHO-Klassifikation von 2000, deren Ki-67-Proliferationsindex bei $<2\%$ lag und die anhand der pathologischen Befunde nicht in die regionären Lymphknoten oder in die Muscularis propria infiltriert waren. Die Gruppen 1a und 1b wurden zusammen betrachtet, da neuere Studien darauf hinweisen, dass die beiden Gruppen auf molekularer Ebene enger miteinander verwandt sind als z.B. die Gruppe 1b mit der Gruppe 2 (Duerr et al. 2008). Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Klassifikation setzt sich von der WHO-Klassifikation von 2010 dadurch ab, dass bereits metastasierte Tumoren trotz niedriger Proliferationsrate (Ki-67-Proliferationsindex $<2\%$) in die *WHO-Gruppe 2* eingeordnet wurden. Darüber hinaus wurden histologisch wenig differenzierte NET in die *WHO-Gruppe 3* eingeordnet.

Die in den pathologischen Befunden benutzten Begriffe zur Charakterisierung der histologischen Wachstumsformen variierten sehr stark. Es wurde unterschieden zwischen insulär, in Nestern wachsend, azinär, trabekulär, pseudoglandulär, girlandenartig, in Ballen angeordnet sowie noch einigen weiteren Wachstumsmustern. Häufig waren Mischformen beschrieben. Daher wurden die NET anhand der alten Pathologiebefunde und bei Unklarheit durch neue visuelle Beurteilung der besseren Übersicht wegen in fünf Gruppen eingeteilt. Es wurde unterschieden zwischen insulärem, azinärem, trabekulärem, diffusem bzw. undifferenziertem und gemischt insulär-azinärem Wachstum. Waren mehrere histologische Wachstumsmuster präsent, dann wurde das vorherrschende Wachstumsmuster zur Charakterisierung genommen. Bei drei Präparaten lagen insuläre und azinäre Wachstumsmuster zu gleichen Teilen vor, so dass diese Tumoren in die Kategorie „gemischt“ fielen. Alle Tumoren, bei denen das Wachstumsmuster aufgrund ihrer histologisch geringen Differenzierung nicht bestimmbar war, wurden in die Kategorie „diffus“ eingeordnet.

Ein Staging nach einer der TNM-Klassifikationen erfolgte nicht, da zu wenig klinische Daten über die Fernmetastasierung vorlagen.

2.3 Anfertigung von Paraffinschnitten

Die Paraffinblöcke wurden zunächst gekühlt. Nach ca. einer halben Stunde wiesen sie die nötige Temperatur auf, damit sie geschnitten werden konnten.

Von allen Paraffinblöcken wurde eine ausreichende Anzahl an Schnitten mit dem Mikrotom Mod. HN 40 (Reichert-Jung/Leica, München, Deutschland) angefertigt. Die Schnittdicke wurde auf 3 µm manuell eingestellt (Klinge: Feather Microtome Blade Stainless Steel, A35, pfm medical, Köln, Deutschland, importiert von Feather Safety Razor Co., LTD, Osaka, Japan). Die eingerollten Paraffinschnitte wurden zunächst in ein Wasserbad gelegt, Falten gegebenenfalls mit zwei Pinseln geglättet und anschließend in ein weiteres, auf ca. 40° Celsius vorgeheiztes Wasserbad (Shandon, Frankfurt, Deutschland) überführt. Die Fixierung der Paraffinschnitte erfolgte auf einem elektrostatisch anziehenden Objektträger (Superfrost Objektträger, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland). Die Objektträger wurden danach in Objektträgerkästen zur Aufbewahrung gelagert.

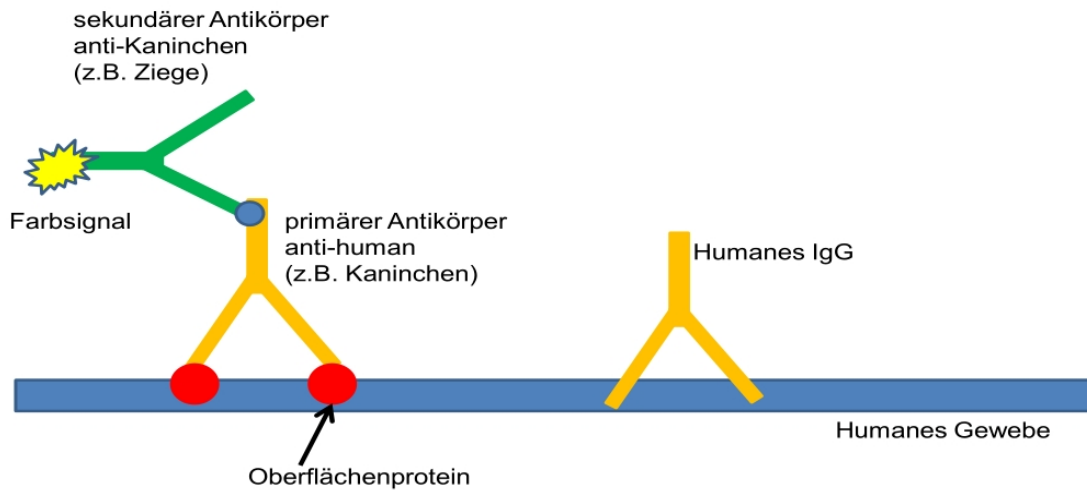
2.4 Einführung in die immunhistochemische Analyse

Die immunhistochemische Analyse dient zur präzisen Lokalisation von Epitopen bestimmter Antigene. Ein Epitop besteht aus ungefähr 10 Aminosäuren (Petrides 1998). Man kann nun spezifische Antikörper einsetzen, um bestimmte Epitope im Lichtmikroskop sichtbar zu machen. Bei der direkten Methode reagiert ein bereits enzymmarkierter Primärantikörper direkt mit dem Antigen (Boenisch 1997). Es ist nur ein Antikörper an der Reaktion beteiligt. Es kommt nicht zur Signalverstärkung, wodurch die Methode nur noch selten angewandt wird (Boenisch 1997). Bei den indirekten Methoden werden zwei oder drei enzymmarkierte Antikörper eingesetzt. Die Enzyme (z.B. Phosphatasen oder Peroxidasen) wandeln ein farbloses Substrat in ein chromogenes Produkt um. Häufig verwendete Antikörper sind die Meerrettich-Peroxidase und die alkalische Phosphatase (Murphy et al. 2008). Der Einsatz eines dritten Antikörpers dient der weiteren Signalverstärkung (Boenisch 1997).

Eine weitere Methode benutzt lösliche Enzym-Immunkomplexe, um eine Färbung zu erzeugen. Dabei bindet ein nicht-enzymmarkierter Sekundärantikörper an den Primärantikörper. Der Sekundärantikörper bindet an einen löslichen Enzym-Immunkomplex. Er fungiert somit als Brückenantikörper (Boenisch 1997).

Die Avidin-Biotin- bzw. Streptavidin-Biotin-Methode setzt biotinylierte Sekundärantikörper ein, an die enzymgekoppeltes Avidin (sogenannte LAB-Färbung) oder vorgefertigte Avidin-Biotin-Enzymkomplexe (sogenannte ABC-Färbung) gebunden sind. Aufgrund der starken Affinität von Biotin zu Avidin (Dissoziationskonstante= 10^{-19}M) hat die Methode eine höhere Affinität im Vergleich zu den direkten und indirekten Methoden (Boenisch 1997).

Abb. 1: Graphische Darstellung der Antikörperbindung



2.5 Vorbehandlung der Präparate

Damit die Präparate mit Antikörpern inkubiert werden konnten, mussten sie zunächst entparaffinisiert werden.

Dazu wurden die Objektträger zunächst zehn Minuten in einer ersten Xylol-Lösung (Applichem, Darmstadt, Deutschland), danach weitere zehn Minuten in einer zweiten Xylol-Lösung (Applichem, Darmstadt, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Präparate jeweils zwei Minuten in ein erstes Gefäß mit 100 % Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland), dann zwei Minuten in ein zweites Gefäß mit 100 % Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) überführt. Darauf folgten drei, jeweils zwei Minuten andauernde Behandlungen mit einer 90 %igen, einer 80 %igen und einer 70 %igen Ethanollösung (Merck, Darmstadt, Deutschland). Um die Entparaffinisierung abzuschließen, wurden die Präparate zunächst für weitere zwei Minuten in deionisiertes Wasser gegeben, welches während der Inkubation zweimal gewechselt wurde. Abschließend kamen die Präparate für drei Minuten in destilliertes Wasser.

Als Puffer diente Zitronensäure-Monohydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland). Es wurde daraus eine 10 mM Lösung angefertigt. Der pH-Wert konnte mit Hilfe von 2 N NaOH (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 6 eingestellt werden. Für die Färbung mit dem Fascinantikörper wurde ein dihydratisierter Puffer verwendet. Dazu wurden 2,94 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf einer Präzisionswaage abgewogen. Zu dem tri-Natriumcitrat-Dihydrat kamen 1000 ml destilliertes Wasser hinzu. Der pH-Wert konnte durch die vorsichtige Zugabe von 0,5 molarer Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) ebenfalls konstant auf 6 gehalten werden. Um den pH-Wert zu kontrollieren, wurde ein pH-Meter (Wissenschaftlich Technische Werkstätten Weilheim, Deutschland) im Erlenmeyerkolben platziert. Der Erlenmeyerkolben wurde bei einer Temperatur von 22,3° Celsius auf eine Zentrifuge gestellt, damit sich das tri-Natriumcitrat-Dihydrat besser löste.

Die Präparate wurden dann in der tri-Natriumcitrat-Pufferlösung 20 Minuten lang in einem Dampfkocher (Braun, Kronberg, Deutschland) inkubiert. Danach kühlten die Präparate 20 Minuten in der Pufferlösung ab.

Anschließend wurden die Präparate in ein neues Glas gestellt. Es folgte ein Waschgang mit einem zweiten Puffergemisch. Dabei kam entweder TBS („tris-buffered-saline“) oder PBS („phosphate-buffered-saline“) als Puffer zur Anwendung.

Die Herstellung von PBS erfolgte, indem ein Fläschchen Instamed (9.55 g/l PBS, DKLBECCO W/O Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ 11/09, BIOCHROM AG Berlin, Deutschland) in 1000 ml Kochsalzlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgelöst wurde. Für die Herstellung des

TBS-Puffers wurden 12 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit 90 g Natriumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 10 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert konnte dabei mit 0,5 molarer Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf 7,5 konstant gehalten werden. Das Glas mit den Objektträgern kam für fünf Minuten auf einen Schüttler (Vortex Genie 2, Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz). Innerhalb der fünf Minuten wurden die Objektträger aus dem Glas genommen. Die Entfernung von überschüssigen Wassertropfen am Rand des Präparats erfolgte mit einem Papiertuch. Dann wurde das Gewebe mit einem Wasser abweisenden Fettstift (DAKO Pen, Glostrup, Dänemark) umrandet. Sobald der Fettstift etwas angetrocknet war, wurden die Präparate wieder zurück in das Glas gestellt, um eine Austrocknung des Gewebes zu verhindern. Es schloss sich die Präparation der Feuchtkammer an. Der Boden der Plastikkammer wurde mit einigen Papiertüchern ausgelegt. Die Füllung der Kammer erfolgte mit destilliertem Wasser. Die Ränder der Präparate wurden erneut vorsichtig mit einem Papiertuch getrocknet. Anschließend wurden die Objektträger auf ein Plastikgerüst in der Feuchtkammer aufgebahrt. Es erfolgte eine Inkubation mit einer 2%igen BSA-Lösung („bovine-serum-albumine“). Bei der Immunfluoreszenzfärbung wurde zur Vorbehandlung ein Gemisch aus einer 1%igen BSA-Lösung und 10 % Ziegen Serum (Dako, Glostrup, Dänemark), entsprechend dem Zweitantikörper gegen den vWF, verwendet. Die Herstellung der 1%igen BSA-Lösung erfolgte, indem 0,5 g Albumin-Pulver vom Schwein (SERVA, Heidelberg, Deutschland) und 50 ml PBS zusammengegeben wurden. Diese Mischung kam auf den Magnetrührer (schütt labortechnics, Göttingen, Germany), bis sich die Anteile komplett in dem Puffer auflösten. Die 2%ige BSA-Lösung bestand dementsprechend aus 1 g Albumin-Pulver vom Schwein, gemischt mit 50 ml PBS. Die Präparate wurden komplett mit dem BSA bedeckt. Es erfolgte daraufhin die Inkubation der Präparate in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur und geschlossenem Deckel für eine Stunde. Es schloss sich eine erneute Waschung mit TBS an, wobei die Präparate für fünf Minuten auf den Schüttler (Vortex Genie 2, Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz) kamen. Diese Prozedur wiederholte sich dreimal. Während des dritten Waschganges begann die Herstellung der Antikörper-Verdünnung. Die Verdünnungen unterschieden sich je nach Antikörper. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der verschiedenen Verdünnungsstufen. Für Fascin diente zum Beispiel eine 1:1000-Verdünnung. Dazu kamen 2 µl des Antikörpers in einen 1998 µl H₂O enthaltenden Eppendorf-Cup. Für einen Objektträger wurden im Vorfeld 200 µl der Antikörper-Dilution veranschlagt. Je nach Anzahl der zu färbenden Objektträger erfolgte die Verdünnung dementsprechend. Insgesamt fanden bei der Färbung der Präparate 14 verschiedene Antikörper Anwendung (Antikörper gegen Chromogranin, CD56, S100, Ki67, α-SMA („α-smooth-muscle-actin“), Desmin, Fascin, CD34, vWF („von-Willebrand-Faktor“), Kim1p, CD3, CD68, CD20, CCR2. Die genauen Eigenschaften der Antikörper und deren

Verdünnungsstufen, die bei der Färbung verwendet wurden, sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Bevor die Beschichtung der Gewebe mit der Antikörper-Dilution stattfinden konnte, wurden die Präparate an den Rändern der Objektträger von überschüssigen Wassertropfen befreit. Der jeweilige Antikörper wurde auf das Präparat pipettiert. Danach erfolgte die Inkubation der Präparate in der Feuchtkammer bei geschlossenem Deckel für eineinhalb Stunden. Die mit Antikörpern gegen vWF-Faktor bedeckten Präparate mussten für die Immunfluoreszenz-methode bei 4° Celsius über Nacht im Kühlschrank gelagert werden. Nachdem die für die Immunhistochemie vorbereiteten Präparate für eineinhalb Stunden in der Feuchtkammer inkubiert worden waren, fanden erneut drei Waschgänge mit dem TBS-Puffer statt, wobei die Präparate wieder für jeweils fünf Minuten auf den Schüttler kamen. Somit waren die Präparate vorbereitet für die Behandlung mit dem Antikörper-Detektionskit.

Tab.6: Darstellung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Vorbehandlung	Hersteller (Katalognummer)	Zielstrukturen
Chromogranin A (Klon DAK-A3)	1:500	Hitze, Citrat (ph=6)	Dako (M869)	Tumorzellen
CD56/NCAM (Klon 123C3)	1:20	Hitze	Zymed (18-0152)	NK-Zellen, Tumorzellen
S100	1:20	Protease (Sigma)	Immunotech (IM1071)	Unreife dendritische Zellen, Tumorzellen
Ki-67	1:200	Hitze, Citrat (ph=6)	Zytomed Systems (MSK 018)	Proliferierende Tumorzellen
α -SMA	1:50	Keine	Immunotech (PM IN 1144)	Glatte Muskulatur
Desmin	1:1	Keine	Immunotech (IM1073)	Fibroblasten, glatte Muskulatur
Fascin (Klon 55K2)	1:1000	Hitze	Chemicon International (MAB 3582)	Dendritische Zellen
CD34	1:20	Keine	Immunotech (Cat.no.1185)	Hämatopoetische Stammzellen
vWf (polyklonal)	1:200	Hitze	Dako (Code A0082)	Humaner vWF, vWF/Faktor-VIII-Komplex
Kim1p	1:6000	Protease (Sigma)	Pathologie Kiel (Geschenk von Prof. Parwaresch, Kiel)	Histiodendritische Zellpopulation
CD3 (polyklonal)	1:100	Hitze	DAKO (A0452)	T-Lymphozyten
CD68-(Klon KP1)	1:6000	Hitze	DAKO (M0814)	Histiozyten
CD20cy (Klon123C3)	1:200	Hitze	DAKO (M0755)	B-Lymphozyten
CCR2 (polyklonal)	1:100	Hitze	Abcam (ab13310)	CC-Chemokin- Rezeptor 2

2.6 Immunhistochemische Färbung

Es wurde das DAKO-Kit (Dako Real Detection Systems, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse, Glostrup, Dänemark Code: K5005) zur Detektion der Antigen-Antikörper-Bindungen verwendet. Das Kit benutzt die in Kapitel 2.4 dargestellte LAB-Methode. Für die Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die im Detektions-Kit vorbereitete LINK-Flasche (Bottle A: Dako Real Link, Biotinylated Secondary Antibody (AB2), Dako, Glostrup, Dänemark) verwendet. Die Beschichtung des Gewebes erfolgte mit zwei bis drei Tropfen des

sekundären Antikörpers. Die Präparate wurden zwanzig Minuten in der Feuchtkammer inkubiert. Für die anschließenden drei Waschgänge diente der TBS-Puffer. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Enzym alkalische Phosphatase aus der LABEL-Flasche (Bottle B: DAKO Streptavidin Alkaline Phosphatase (AP), Dako, Glostrup, Dänemark) für 20 Minuten. Für die Beschichtung des Gewebes wurden ebenfalls zwei bis drei Tropfen je Objektträger verwendet, so dass das Präparat komplett bedeckt war. Wiederum schlossen sich drei Waschgänge mit TBS-Puffer an. Während des dritten Waschgangs begann die Vorbereitung der chromogenen Lösung („fast-RED“). Die Vorbereitung erfolgte nach der Anleitung des Detektionskits. Es wurden 1000 µl des Alkalische-Phosphatase-Substrat-Puffers (Bottle F: DAKO Real AP Substrate Buffer, DAKO, Dänemark, Glostrup), der bereits fertig in dem Detektionskit enthalten war, in einen 1000-µl-Eppendorf-Cup gegeben. Dazu kamen 5 µl von dem ebenfalls im Detektionskit enthaltenen Levamisade (Bottle G: DAKO Real Levamisade, DAKO, Glostrup, Dänemark). Die Mischung wurde gevortext. Danach wurden 750 µl der vorbereiteten Lösung in einen neuen Eppendorf-Cup überführt. In diese Mischung kamen jetzt nacheinander jeweils 30 µl der in dem Detektionskit enthaltenen Lösungen C (Bottle C: DAKO Real chromogen Red 1, DAKO, Glostrup, Dänemark), D (Bottle D: DAKO Real chromogen Red 2, DAKO, Glostrup, Dänemark), und E (Bottle E: DAKO Real chromogen Red 3, DAKO, Glostrup, Dänemark), wobei der Eppendorf-Cup zur Vermeidung von Präzipitationsreaktionen nach jedem Schritt gevortext wurde. Anschließend erfolgten zwei Waschgänge mit destilliertem Wasser. Nach dem zweiten Waschschrift blieben die Objektträger für drei Minuten im Glas. Danach folgte die Färbung der Objektträger mit Hämatoxylin für 30 Sekunden. Dann wurden die Präparate unter fließendem Wasser für maximal fünf Minuten gebläut. Anschließend erfolgte die Abdeckung des Gewebes mit Kaisers Glyceringelatine (Merck, Darmstadt, Deutschland). Dazu wurde die Gelatine zunächst bei 56° Celsius in einem Inkubator (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verflüssigt. Die Kaisers Glyceringelatine wurde dann auf die Objektträger geträufelt. Danach erfolgte die Abdeckung mit einem Deckgläschen. Überstehende Gelatine wurde mit einem Papiertuch entfernt. Kleine Bläschen wurden mit der Pipettenspitze vorsichtig weggedrückt. Dann trockneten die Präparate über Nacht.

2.7 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden die Präparate, nachdem sie über Nacht mit dem ersten Antikörper inkubiert im Kühlschrank gelegen hatten, zunächst dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Präparation mit dem zweiten Antikörper. Für vWF wurde als Zweitantikörper ein Ziegenantikörper („Goat-anti-rabbit“, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) genommen, der gegen Kaninchen gerichtet ist. Der Anti-Kaninchenanti-

körper wurde 1:400 in PBS verdünnt. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer. Anschließend wurden die Präparate erneut dreimal jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen. Die Kernfärbung schloss sich danach an.

Dazu diente 4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) „nucleic-acid-stain“ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), welches mit destilliertem Wasser 1:1000 verdünnt auf die Präparate gegeben wurde. Die Präparate wurden anschließend für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur in der abgedunkelten Feuchtkammer inkubiert. Danach erfolgte das Waschen mit PBS für fünf Minuten und ein weiteres Mal eine Minute lang mit destilliertem Wasser. Letztendlich wurden die Präparate mit Fluoromount G (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA) eingedeckt. Sie wurden für einige Minuten getrocknet und waren dann für die Analyse unter dem Fluoreszenz-Mikroskop bereit. In der Zwischenzeit lagerten die Präparate abgedunkelt im Kühlschrank.

2.8 Funktionelle Darstellung der untersuchten Oberflächenantigene

2.8.1 Einteilung der Oberflächenantigene

Die untersuchten Marker teilte ich in verschiedene Gruppen. Die Antigene Chromogranin, CD56/NCAM, S100 und Ki-67 als Proliferationsmarker fasste ich unter der Rubrik Tumorzellmarker zusammen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass CD56/NCAM und S100 darüber hinaus Marker für Immunzellen sind. CD56/NCAM dient als Marker für NK-Zellen. S100 ist als Marker für unreife dendritische Zellen bekannt. Die Antigene α -SMA, Desmin, Fascin, CD34 und vWF fallen in die Kategorie der Tumorstromamarker, wobei Fascin auch als Marker für dendritische Zellen dient. Kim1p, CD3, CD68 und CD20 sind Immunzellmarker. CCR2 wurde separat als Chemokinrezeptormarker betrachtet. Die folgende Darstellung gibt einen Überblick über das Vorkommen und die Funktion der untersuchten Oberflächenantigene.

2.8.2 Tumorzellmarker

2.8.2.1 Chromogranin

Chromogranine und Sekretogranine (auch als „Granine“ bezeichnet) sind saure sekretorische Proteine, die in den Vesikeln von neuroendokrinen Zellen gespeichert werden (Taupenot et al. 2003). Die drei „klassischen“ Chromogranine sind Chromogranin A, Chromogranin B und Sekretogranin II; „Granine“ bestehen aus Einzelstrang-Polypeptidketten, die zwischen 180 und 700 Aminosäuren enthalten (Taupenot et al. 2003).

Sie spielen eine Rolle bei der Bildung und Abgabe sekretorischer Granula in neuroendokrinen Zellen (Taupenot et al. 2003). Chromogranin A und B sind bekannte Marker für alle neuroendokrinen Tumoren. Sowohl funktionelle Tumoren als auch nicht-funktionelle Tumoren des neuroendokrinen Systems können Chromogranin sezernieren (Vinik et al. 2009). Chromogranine können immunhistochemisch in NET nachgewiesen werden (Wilander und Grimelius 1993).

2.8.2.2 CD56/NCAM („neuronal-cell-adhesion-molecule“)

CD56 ist ein Membranglykoprotein, das in verschiedenen Isoformen auftritt, welche durch alternatives Spleißen eines einzelnen Gens auf dem Chromosom 11 zustande kommen (Lanier et al. 1991). Hauptsächlich wird CD56 von verschiedenen Untergruppen natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) exprimiert (Poli et al. 2009). Darüber hinaus ist CD56 als NCAM („neuronal-cell-adhesion-molecule“) bekannt, das auf Neuronen exprimiert wird und Zellinteraktionen vermittelt. Unter anderem zeigt das kleinzellige Bronchialkarzinom, das Gemeinsamkeiten zu neuronalen Geweben aufweist, eine Expression von NCAM (Onganer et al. 2005). CD56 ist ein Tumormarker in NET (Al-Khafaji et al. 1998).

2.8.2.3 S100

Die S100-Protein-Familie besteht aus einer Gruppe von Proteinen, die zu den niedrig molekular gewichtigen Proteinen gehören (Molekulargewicht zwischen 9 und 14 kD); sie zählen zu der Gruppe der Kalzium-modulierten Proteine und werden ausschließlich in Wirbeltieren exprimiert (Donato 2001). Sie haben vielfältige intrazelluläre und extrazelluläre Funktionen. Intrazellulär werden die Protein-Phosphorylierung, Enzymaktivierung und die Calcium-Homöostase reguliert (Donato 2001). Die S100-Proteine spielen u.a. eine Rolle bei der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, z.B. p53 (Donato 2001). Sie sind bei der Exozytose, im Zell-Zyklus und bei der Regulation des Zytoskeletts involviert; extrazellulär wirken S100-Proteine sowohl neurotrophisch als auch toxisch; sie spielen eine Rolle bei Entzündungsprozessen und im extrinsischen Weg des plasmatischen Gerinnungssystems (Donato 2001). S100-Proteine werden von einer Reihe Tumoren exprimiert. Dazu gehören unter anderem maligne Melanome, Schwannome, Neurofibrome und maligne periphere Nervenscheidentumoren (Nonaka et al. 2008). Darüber hinaus ist S100 ein Marker für unreife dendritische Zellen wie z.B. die kutanen Langerhanszellen (Hussein 2005). Über S100 als Tumormarker für neuroendokrine Tumoren gibt es in der Literatur nur wenige Daten. Eine Studie über die immunhistologische Analyse von gastrointestinalen und pulmonalen Karzinoiden konnte eine Positivität für S100 von bis zu 50% nachweisen (Al-Khafaji et al. 1998).

2.8.2.4 Ki-67

Ki-67 ist ein großes Protein von ungefähr 395 kD (Brown und Gatter 2002). Obwohl die genaue Funktion unbekannt ist, weiß man, dass es bei der Regulation des Zell-Zyklus eine Rolle spielt. Proliferierende Zellen exprimieren Ki-67, nicht-proliferierende dagegen nicht (Gerdes et al. 1991), so dass Ki-67 als Proliferationsmarker in Tumorzellen zur Anwendung kommt (Endl und Gerdes 2000). In einer Vielzahl von Tumorentitäten wurde Ki-67 als prognostischer Faktor identifiziert (Berney et al. 2009, Bruna et al. 2007, Jones et al. 2008). Darüber hinaus ist der Ki-67-Index auch in gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren als prognostischer Indikator zur Abschätzung des biologischen Verhaltens etabliert (Jamali und Chetty 2008).

2.8.3 Tumorstromamarker

2.8.3.1 α -SMA („alpha-smooth-muscle-actin“)

Aktin ist ein Protein, das vor ungefähr 70 Jahren im Muskelgewebe entdeckt wurde. Es bildet eine filamentäre Struktur aus, die entscheidend für die intrazelluläre mechanische Stabilität ist. Aktin ist an Transportvorgängen innerhalb der Zelle beteiligt (Pollard und Cooper 2009). α -SMA ist ein Marker für glatte Muskelzellen, wie sie u.a. in ausdifferenzierten Myofibroblasten vorkommen (Nowak et al. 2009). Leiomyome und Leiomyosarkome exprimieren regelmäßig α -SMA. Ungefähr 20-30 % aller gastrointestinalen Stromatumoren weisen ebenfalls eine Aktin-Positivität auf (Paal und Miettinen 2001). In einer klinisch-pathologischen Studie über Rhabdomyosarkome zeigten 12 von 56 Rhabdomyosarkomen (21,4 %) eine Positivität für α -SMA (Stock et al. 2009).

2.8.3.2 Desmin

Desmin ist ein Protein, das auf intermediären Filamenten sitzt, die typisch sind für viele Typen myogener Zellen (Moll et al. 1982). Viele muskuläre Tumoren exprimieren Desmin. Regelmäßig lässt sich Desmin im Leiomyo- bzw. im Rhabdomyosarkom nachweisen (Nicolas et al. 2010, Stock et al. 2009). Eine fokale Expression zeigt unter anderem auch das mesenchymale Chondrosarkom (Fanburg-Smith et al. 2010).

2.8.3.3 Fascin

Fascin stellt eine Familie von Proteinen dar, zu denen „Seeigel Fascin“, „HeLa-55kD-actin-bundling-protein“ und das „Drosophila-singed“-Protein gehören (Yamashiro et al. 1998). Fascin spielt bei der Vernetzung von Aktinfilamenten eine Rolle (Matsudaira 1994). Dadurch kann es sowohl in Ausläufern dendritischer Zellen (Al-Alwan et al. 2001, Ross et al. 1998), als auch in Tumorgewebe mit metastatischem Potential gefunden werden. Zum Beispiel ist in

ungefähr einem Drittel aller kolorektalen Karzinome Fascin im Zytoplasma der Tumorzellen detektierbar (Ozerhan et al. 2010). Weitere Beispiele für Tumorentitäten, in denen Tumorzellen eine Fascin-Positivität zeigen, sind extrahepatische Gallengangskarzinome (Won et al. 2009), Urothelkarzinome der Harnblase (Karasavvidou et al. 2008) und seröse Ovarialkarzinome (Daponte et al. 2008). Darüber hinaus wird Fascin unter anderem von Endothelzellen, Nervenfasern, endokrinen Geweben und in der Niere (Zhang et al. 2008) exprimiert.

2.8.3.4 CD34

CD34 ist ein glykosyliertes, transmembranöses Protein mit einem Molekulargewicht von 115 kD, das zur Sialomucin-Familie gehört (Krauter et al. 2001). CD34 wird als Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen eingesetzt (Kiernan et al. 2009). CD34-positive Vorläuferzellen können sich zu Endothelzellen bzw. zu Zellen mit Endothelzell-ähnlichem Phänotyp differenzieren (Asahara et al. 1997). Endothelzellen exprimieren daher CD34. Dadurch kann die mikrovaskuläre Dichte eines Gewebes abgeschätzt werden (Svagzdys et al. 2009). Wahrscheinlich spielt CD34 eine Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von lymphohämatopoetischen Stammzellen. Dennoch bleibt die genaue Funktion von CD34 unklar (Krauter et al. 2001).

2.8.3.5 vWF (von-Willebrand-Faktor)

vWF ist ein großes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 800 und 20000 kDa. Es besteht aus verschiedenen großen Multimeren (Ledford-Kraemer 2010). vWF wird von Megakaryozyten und Endothelzellen synthetisiert. Während vWF in den Megakaryozyten in α -Granula gespeichert wird, übernehmen die sogenannten Weibel-Palade-Körper die Speicherfunktion in den Endothelzellen; man unterscheidet weiterhin zwischen vWF, der in den Thrombozyten gespeichert ist, und dem Plasma-vWF (McGrath et al. 2010). Die Hauptfunktion des vWF besteht im Vernetzen von Blutplättchen mit frei liegendem Kollagen bei Endothelschaden im Rahmen der primären Hämostase. Plasma-vWF kann an Gerinnungsfaktor VIII binden. Diese Funktion existiert für den in den Blutplättchen gespeicherten vWF nicht (McGrath et al. 2010). Darüber hinaus spielt vWF in der Tumormetastasierung eine Rolle. Es konnte u.a. in einer humanen Melanomzellkultur gezeigt werden, dass die vWF-Sekretion stimuliert wird (Kerk et al. 2010). vWF wird verdächtigt, den Metastasierungsprozess von Tumorzellen zu fördern, indem er, ähnlich wie bei der Interaktion mit Blutplättchen, die Bewegung der Tumorzellen ins Blut fördert. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass Zellen einer murinen Melanomzellreihe an vWF binden können. Allerdings war die pulmonale Metastasierung bei Abwesenheit von vWF ausgeprägter (Terraube et al. 2006).

2.8.4 Immunzellmarker

2.8.4.1 Kim1p

Kim1p kann als Marker für fibrohistiozytäre Zellen aufgefasst werden (Graeme-Cook et al. 1993). Im Lymphknoten werden Monozyten, bzw. Makrophagen von dem Antikörper gegen Kim1p erkannt (Radzun et al. 1991). In gastrointestinalen Stromatumoren dient Kim1p darüber hinaus als Marker für dendritische Zellen (Cameron et al. 2008). Eine Studie zur immunhistochemischen Charakterisierung von monozytären Zellen des oberen Atemtrakts zeigt ebenfalls eine Expression von Kim1p bei einer dendritischen Zellpopulation (Graeme-Cook 1993 et al.).

2.8.4.2 CD3

Sechs Polypeptidketten mit vier verschiedenen, transmembranösen Ketten (Gamma, Delta, Epsilon, Zeta) bilden den CD3-Rezeptor (Saito und Yamazaki 1996). CD3 wird bereits früh in Blasten des Thymus, zunächst intrazytoplasmatisch, später auch auf der Oberfläche der Zellen, exprimiert (Campana et al. 1987). Verschiedene Antikörper gegen CD3, darunter sowohl monoklonale (Alibaud et al. 2000) als auch polyklonale (Mason et al. 1989), sind dafür geeignet, T-Lymphozyten und verwandte Lymphome zu markieren.

2.8.4.3 CD68

CD68 ist ein transmembranöses Glykoprotein, das vor allem in Lysosomen-, bzw. Endosomen-reichen Zellen zu finden ist (Ross et al. 2011). Antikörper, die gegen bestimmte Epitope des CD68 gerichtet sind, gelten als Marker für Makrophagen; bei der Differenzierung der myelomonozytären (FAB-M4) bzw. monozytären (FAB-M5) akuten Leukämie spielen spezifische Antikörper gegen CD68 eine wichtige Rolle (Falini et al. 1993).

2.8.4.4 CD20

Die CD20-Genfamilie besteht aus 12 Subgruppen unterschiedlicher Gene, die auf Chromosom 11 liegen, und deren Proteine in aller Regel vier bzw. in seltenen Fällen zwei transmembranöse Domänen aufweisen (Liang et al. 2001). Die genaue Funktion von CD20 ist unklar (Du et al. 2007). Es wird jedoch davon ausgegangen, dass CD20 an der Ausformung eines Kalziumkanals beteiligt ist (Li et al. 2003) und damit zelluläre Vorgänge der Signaltransduktion steuert (Liang et al. 2001). CD20 wird, mit Ausnahme von der Prä-B-Zelle und der Plasmazelle, von allen B-Zellen exprimiert (Dörken et al. 1989). Verschiedene Neoplasien, wie die akute lymphoblastische Leukämie (ALL), die chronische lymphoblastische Leukämie (CLL), die Haarzelleukämie und das Burkitt-Lymphom zeigen eine Expression von CD20 auf der Zelloberfläche (Pezzutto et al. 1989).

2.8.5 Chemokinrezeptormarker

2.8.5.1 CCR2 (CC-Chemokin-Rezeptor 2)

CCR2 (CC-Chemokin-Rezeptor 2) ist der Rezeptor für MCP („monocyte-chemoattractant-protein“). Hauptliganden sind MCP 1-4 (Mantovani 1999). CCR2 gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Tanaka et al. 2001). Er hat eine ungefähre Länge von 355 Aminosäuren und besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit dem Interleukin-8-Rezeptor (Gao et al. 1993). CCR2 wird hauptsächlich auf Monozyten und von aktivierten T-Zellen bzw. natürlichen Killerzellen exprimiert (Mantovani 1999). Außerdem ist CCR2 auf Endothelzellen nachweisbar (Salcedo et al. 2000). Man unterscheidet innerhalb der CCR2-Familie zwei verschiedene Rezeptoren, den CCR2A und den CCR2B. CCR2B ist auf Monozyten und auf T-Zellen stärker exprimiert und scheint für die Interaktion mit MCP1 die wichtigere Rolle zu spielen (Tanaka et al. 2001). Darüber hinaus ist CCR2 im Zytoplasma bzw. auf der Zellmembran der Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten exprimiert. So konnte CCR2 unter anderem im Prostatakarzinom (Lu Y et al. 2007), im Glioblastom (Liang et al. 2008) und in Myelomzellen (Van de Broek et al. 2006) nachgewiesen werden. In Zusammenspiel mit einem seiner Hauptliganden, dem MCP-1, der auch unter CCL2 (CC-Ligand 2) bekannt ist, spielt er eine wichtige Rolle bei der Tumorprogression. Über die CCR2/CCL2-Achse wird unter anderem die Migration von Tumorzellen beeinflusst (Dagouassat et al. 2010). Weiterhin hat sich gezeigt, dass die Angiogenese durch CCL2 direkt beeinflusst werden kann (Salcedo et al. 2000). Das Zusammenspiel zwischen CCL2 und CCR2 kann Metastasierungsprozesse fördern (Lu X und Kang 2009).

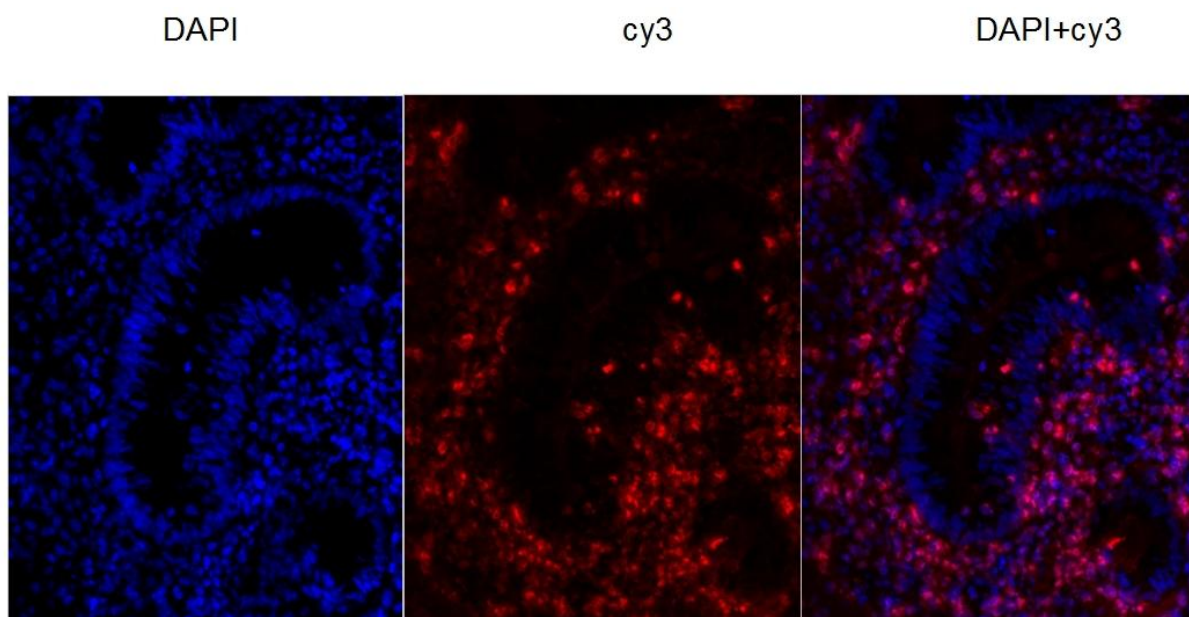
2.9 Auswertungsmethoden

2.9.1 Mikroskopische und fotografische Auswertung

Die immunhistochemischen Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) fotografiert. Bei den Präparaten, die mit den Antikörpern gefärbt waren, die für die quantitative Analyse infrage kamen (Kim1p, CD3, CD68, CD20), wurden an drei verschiedenen repräsentativen Stellen Fotos in der 100fachen Vergrößerung gemacht. Für die anderen Präparate wurde ein repräsentatives Foto in der 100fachen Vergrößerung an einer geeigneten Stelle erstellt. Darüber hinaus wurde bei den meisten Präparaten eine repräsentative Stelle in der 200fachen Vergrößerung und in der 400fachen Vergrößerung fotografiert, um eine deskriptive Aussage über die Morphologie machen zu können.

Die Immunfluoreszenz-Präparate wurden unter dem Immunfluoreszenz-Mikroskop (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) fotografiert. Das Aufsuchen einer geeigneten Stelle erfolgte unter Zuhilfenahme der verschiedenen Fluoreszenzkanäle. Die Fotos wurden mit dem 20er Objektiv, also in 200facher Vergrößerung in den Kanälen cy3 (rot) und DAPI (blau) aufgenommen. Als Bildverarbeitungsprogramm diente AxioVision 4.7.rel (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH, Jena, Deutschland). Mit dem Programm konnte in beiden Kanälen ein Livebild erzeugt werden, um eine Fokussierung in einer Ebene zu gewährleisten.

Abb. 2: Beispiele für Immunfluoreszenzbilder in unterschiedlichen Kanälen, 200fache Originalvergrößerung, Visualisierung der Antikörperfärbung gegen 4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und CD3 (cy3)

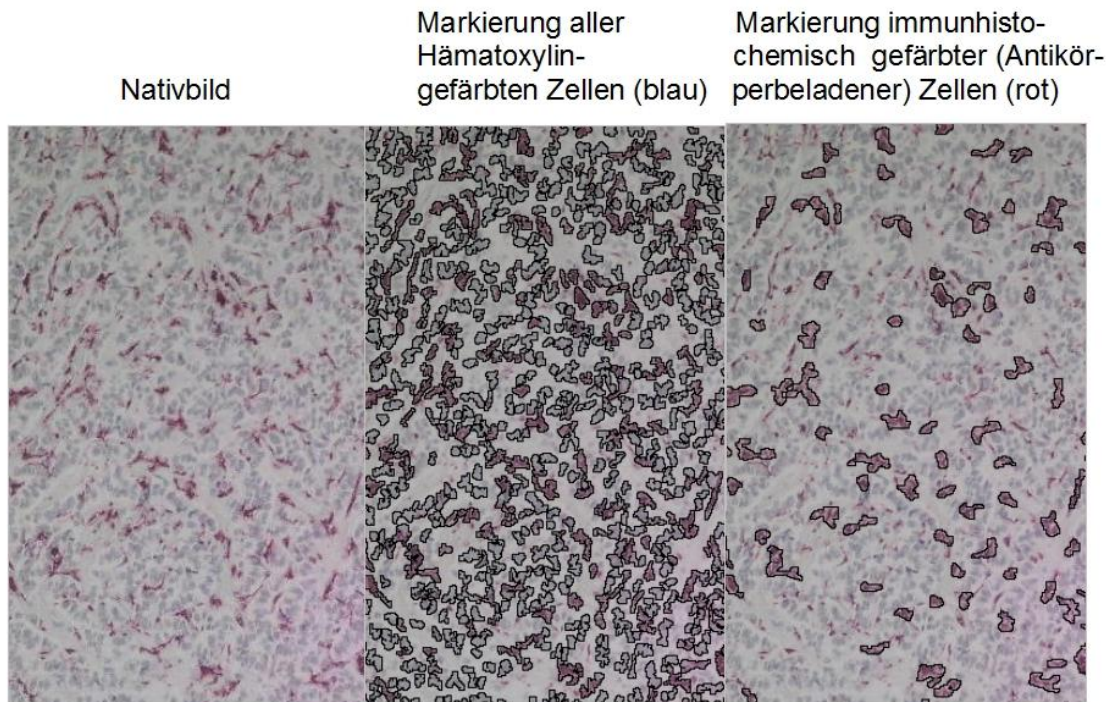


2.9.2 Computergestützte Auswertung

Die Präparate, die mit Antikörpern gegen die Tumormarker (Chromogranin, CD56, S100) und die Präparate, die mit dem Antikörper gegen CCR2 gefärbt wurden, ließen sich computergestützt auswerten, indem das Programm den Grad der Intensität der Färbung visuell erfasste. Der Grad der Positivität wurde mithilfe eines „Scores“ quantifiziert.

Die digitalen Fotos der einzelnen Präparate, die mit Antikörpern gegen Immunzellen (Kim1p, CD3, CD68, CD20) gefärbt waren, wurden mit einer computergestützten Anwendung ausgewertet. Das Programm wurde von Dr. Robert Cameron erstellt (Cameron et al. 2008). Es markiert und zählt zunächst alle Hämalaun-gefärbten Zellen (blau), dann alle immunohistochemisch gefärbten Zellen (rot), die im Präparat sichtbar sind. Die Areale der Präparate auf den Fotos in der 100fachen Vergrößerung entsprechen jeweils einer Fläche von 1,3 mm².

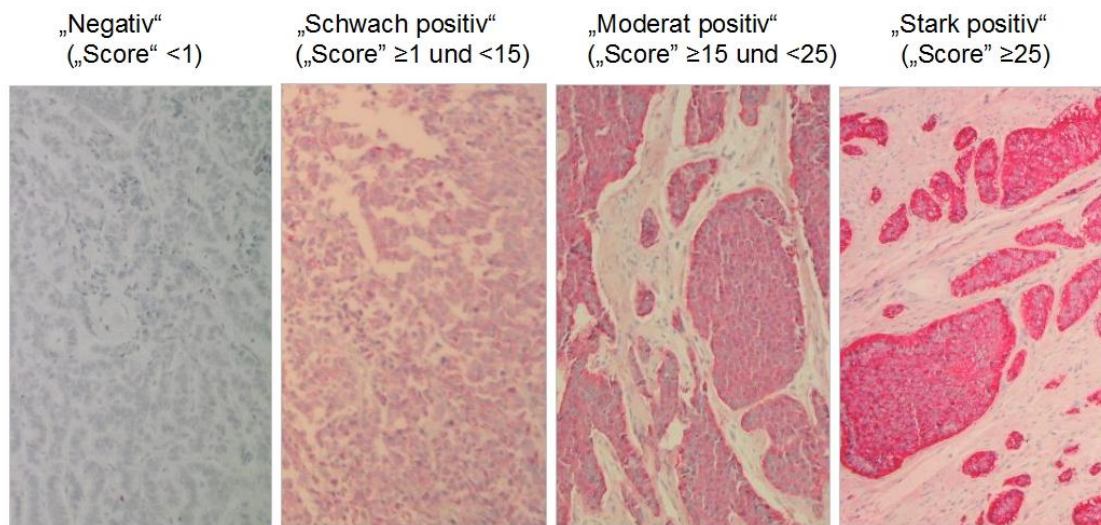
Abb. 3: Beispiel für die computergestützte Markierung, 100fache Originalvergrößerung



2.10 Statistik

Die Präparate, die mit Antikörpern gegen die Tumormarker (Chromogranin, CD56, S100), und die Präparate, die mit dem Antikörper gegen CCR2 gefärbt wurden, habe ich anhand eines weiteren Computerprogramms, in dem ein Punkte-„Score“ für den Grad der Gewebefärbung vergeben wurde, in vier Gruppen aufgeteilt. Präparate mit einem „Score“ <1 fielen in die Kategorie „negativ“, Präparate mit einem „Score“ ≥ 1 und <15 habe ich in die Kategorie „schwach positiv“ eingeordnet. Präparate mit einem „Score“ ≥ 15 und <25 habe ich als „moderat positiv“ bzw. „mäßig positiv“ und Präparate mit einem „Score“ ≥ 25 als „stark positiv“ gewertet. In der Abbildung 4 werden die unterschiedlichen Färbungsintensitäten dargestellt.

Abb. 4: Darstellung der unterschiedlichen Färbungsintensitäten anhand von Chromograninfärbungen, 100fache Originalvergrößerung



Die Präparate, die mit Antikörpern gegen die Stromamarker (α -SMA, Desmin, Fascin, CD34) gefärbt wurden, habe ich bei vorhandener Färbung als positiv und bei nicht vorhandener Färbung als negativ eingestuft. Die prozentuale Anzahl der positiven Präparate wurde für die Stromamarker angegeben. Die Standardabweichung wird in Klammern aufgeführt.

Aus der Anzahl der immunohistochemisch gefärbten Zellen und der Anzahl der Hämalaun gefärbten Zellkerne konnte ein Quotient gebildet werden, der der prozentualen Anzahl der gefärbten Zellen entspricht. Es wurde bei den Antikörpern, die relevant für die quantitative Analyse waren (Kim1p, CD3, CD68, CD20), die Mittelwerte der drei repräsentativen Fotos, sowohl für die immunohistochemisch-markierten Zellen als auch für die Hämalaun-markierten Zellen, ermittelt. Für jedes Präparat wurde ein mittlerer Quotient gebildet. Die Quotienten für die unterschiedlichen Präparate konnten nun in Abhängigkeit von den Organlokalisationen und den WHO-Gruppen miteinander verglichen werden.

Bei signifikanten Unterschieden zwischen den Mittelwerten wurde zur Bestätigung der Students-t-Test angewandt. Bei Differenzen der p-Werte unter 0,01 (entspricht <1 %) wurde der Test als statistisch signifikant gewertet. Kontinuierliche Variablen wurden mithilfe der Korrelationsanalyse ausgewertet. Bei Differenzen der p-Werte unter 0,01 (entspricht <1 %) wurde der Test als statistisch signifikant gewertet.

Die Standardabweichung wurde generell in Klammern angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Darstellung des Tumorkollektivs

3.1.1 Organlokalisierung, embryologischer Ursprung, WHO-Klassifikation und Grading

Von den 55 Präparaten der NET entstammten 32 Präparate (58,2 %) dem *Dünndarm*, 13 Präparate (23,6 %) dem *Kolorektum* und 10 Präparate (18,2 %) dem *Pankreas*. 17 Präparate (30,9 %) waren embryologisch dem *Vorderdarm*, 25 Präparate (45,5 %) dem *Mitteldarm* und 13 Präparate (23,6 %) dem *Hinterdarm* zuzuordnen. 15 Präparate (27,3 %) gehörten zur *WHO-Gruppe 1* der Klassifikation von 2000 (Klöppel et al. 2007). Von den 15 Präparaten (27,3 %) waren 12 Präparate (80 %), die der Gruppe 1a zugeordnet werden konnten, 3 Präparate (20 %) fielen in die Gruppe 1b. 29 Präparate (52,7 %) ließen sich der *WHO-Gruppe 2* zuordnen, 11 Präparate (20 %) der *WHO-Gruppe 3*. Bei der Bestimmung des Gradings wurde das Grading-System der Konsensus-Konferenzen von Frascati zugrunde gelegt (Rindi et al. 2006b, 2007, Klöppel et al. 2007) (siehe auch Tabelle 3). 39 Präparate (70,9 %) waren *G1-Tumoren*, 8 Präparate (14,5 %) *G2-Tumoren* und 8 Präparate (14,5 %) *G3-Tumoren*. Das Grading nach den Konsensus-Konferenzen von Frascati entspricht der Einteilung der NET in die drei prognostischen Gruppen: *Neuroendokrine Neoplasie Grad 1 (NEN-G1)*, *Neuroendokrine Neoplasie Grad 2 (NEN-G2)* und *Neuroendokrines Karzinom Grad 3 (NEC-G3)* nach der neuen WHO-Klassifikation von 2010 (Klimstra et al. 2010).

Abb. 5: Verteilung der NET in Abhängigkeit der Organlokalisierung

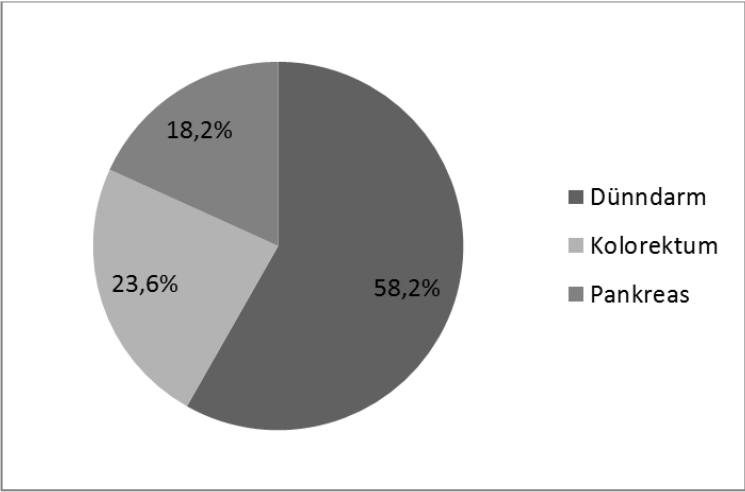


Abb. 6: Verteilung der NET in Abhängigkeit des embryologischen Ursprungs

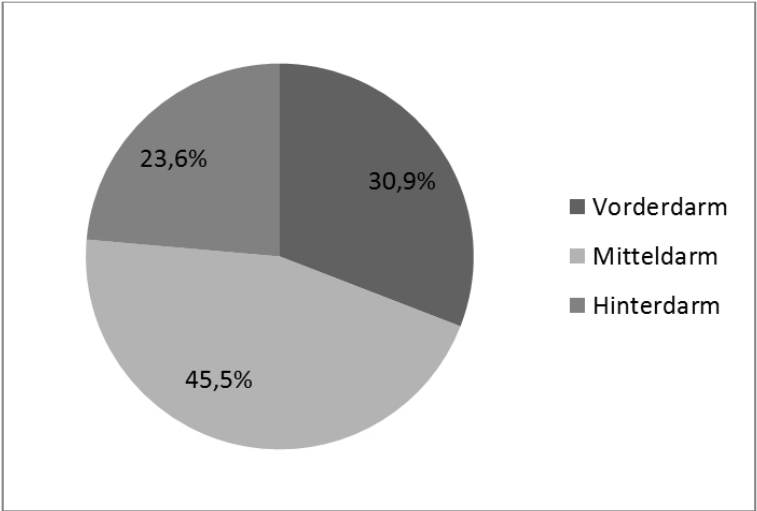


Abb. 7: Verteilung der NET in Abhängigkeit der WHO-Klassifikation von 2000

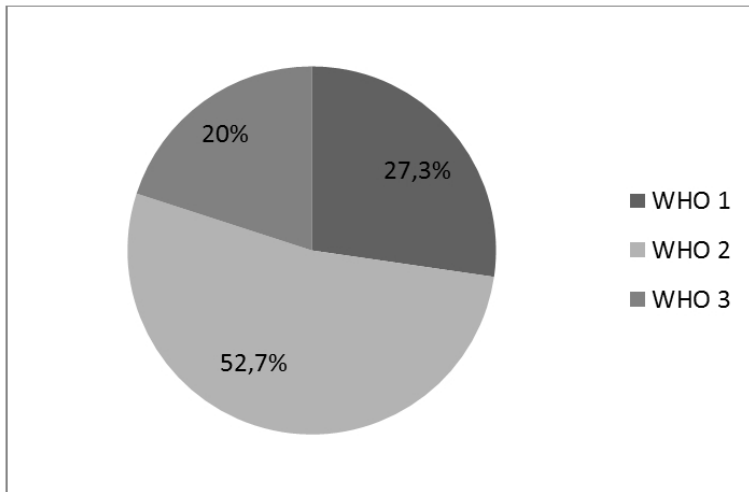
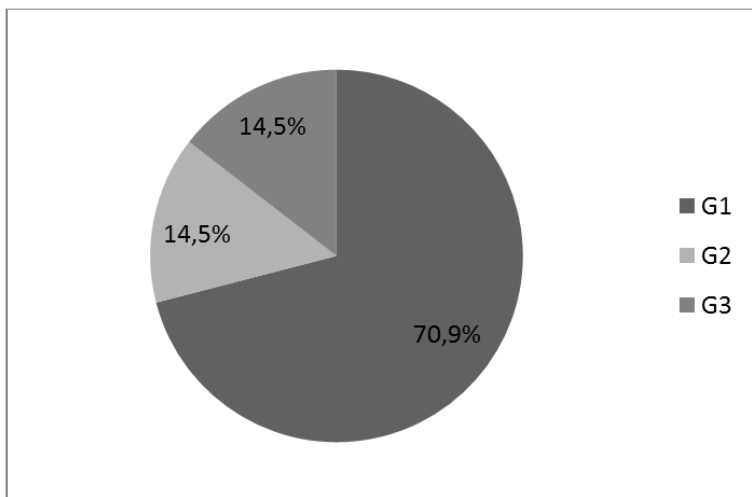


Abb. 8: Verteilung der NET in Abhängigkeit des Gradings (Ki-67-Proliferationsindex) nach den Konsensus-Konferenzen von Frascati (Rindi et al. 2006b, 2007, Klöppel et al. 2007), entsprechend der Einteilung in die drei prognostischen Gruppen (NEN-G1, NEN-G2, NEC-G3) nach der WHO-Klassifikation von 2010



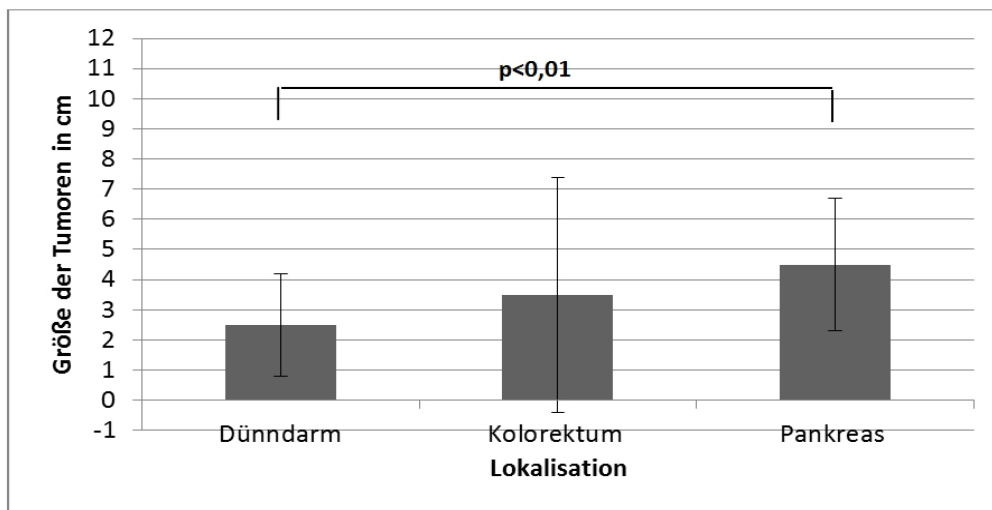
Auffällig war der große Anteil an *G1-Tumoren* mit niedrigem Ki-67-Proliferationsindex (<2 %), die wegen ihrer Größe, aufgrund nodaler Metastasierung bzw. Angioinvasion und Invasion der Muscularis propria in die *WHO-Gruppe 2* nach der WHO-Klassifikation von 2000 eingeordnet wurden (Klöppel et al. 2007).

3.1.2 Größe der Tumoren

Insgesamt lag die durchschnittliche maximale Größe der primären NET bei 3,1 cm ($\pm 2,5$ cm). Die Präparate des *Dünndarms* hatten eine durchschnittliche maximale Tumorgöße von 2,5 cm ($\pm 1,7$ cm), die Präparate des *Kolorektums* eine durchschnittliche maximale Tumorgöße von 3,5 cm ($\pm 3,9$ cm) und die Präparate des *Pankreas* eine durchschnittliche maximale Tumorgöße von 4,5 cm ($\pm 2,2$ cm). NET des *Pankreas* waren zum Zeitpunkt der Operation signifikant größer als NET des *Dünndarms* ($p < 0,01$).

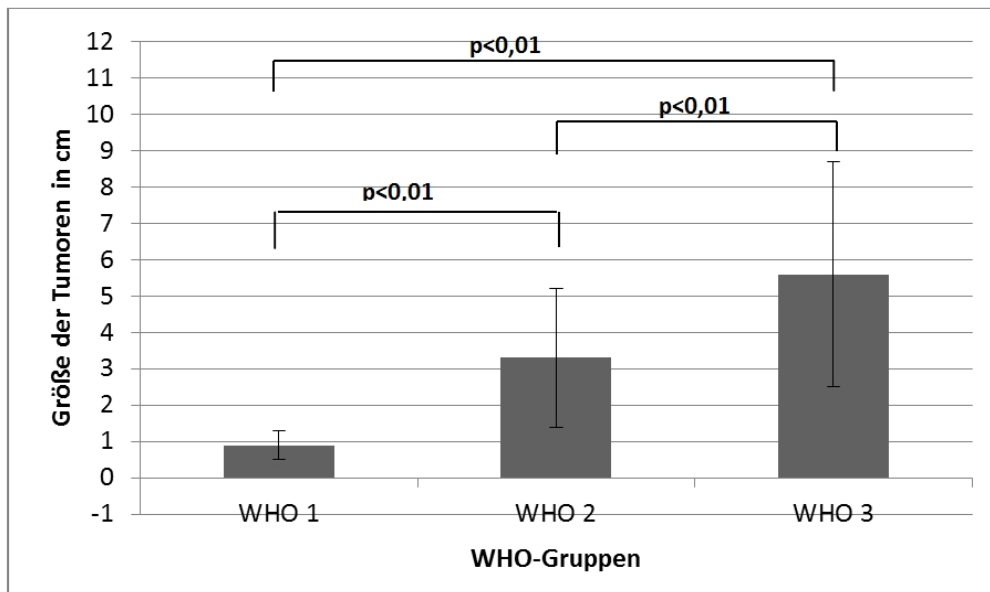
Die Präparate der *WHO-Gruppe 1* hatten eine durchschnittliche maximale Tumorgöße von 0,9 cm ($\pm 0,4$ cm), die Präparate der *WHO-Gruppe 2* eine durchschnittliche maximale Tumorgöße von 3,3 cm (± 2 cm) und die Präparate der *WHO-Gruppe 3* eine durchschnittliche maximale Tumorgöße von 5,6 cm ($\pm 3,1$ cm). NET der *WHO-Gruppe 3* waren signifikant größer als NET der *WHO-Gruppe 1* und NET der *WHO-Gruppe 2* ($p < 0,01$). NET der *WHO-Gruppe 2* waren signifikant größer als NET der *WHO-Gruppe 1* ($p < 0,01$). Die Ergebnisse sind zu erwarten gewesen, da die Größe bei der Kategorisierung in die WHO-Gruppen als Kriterium einfließt.

Abb. 9: Darstellung der maximalen durchschnittlichen Tumorgöße der NET in Abhängigkeit von der Lokalisation



NET des *Pankreas* waren signifikant größer als NET des *Dünndarms* ($p < 0,01$).

Abb. 10: Darstellung der maximalen durchschnittlichen Tumorgröße der NET in Abhängigkeit von der WHO-Gruppe



NET der *WHO-Gruppe 3* waren signifikant größer als NET der *WHO-Gruppe 1* und NET der *WHO-Gruppe 2* ($p < 0,01$). NET der *WHO-Gruppe 2* waren signifikant größer als NET der *WHO-Gruppe 1* ($p < 0,01$). Die Ergebnisse sind zu erwarten gewesen, da die Größe bei der Kategorisierung in die WHO-Gruppen als Kriterium einfließt.

3.1.3 Geschlechts- und Altersverteilung

28 der 55 Patienten waren weiblich (50,9 %), 27 waren männlich (49,1 %). Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis Frauen zu Männern von 1,04:1,0. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 40 und 93 Jahren und betrug im Mittel 64,7 Jahre ($\pm 13,9$ Jahre). Bei den Frauen betrug das durchschnittliche Alter 64,9 Jahre ($\pm 14,6$ Jahre), bei den Männern 64,6 Jahre ($\pm 13,3$ Jahre).

Bei den NET des *Dünndarms* waren 14 der 32 Patienten weiblich (43,8 %) und 18 männlich (56,3 %). Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis Frauen zu Männern von 1,0:1,29. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 41 und 93 Jahren und betrug im Mittel 67,7 Jahre ($\pm 12,6$ Jahre). Bei den Frauen betrug das durchschnittliche Alter 69,3 Jahre ($\pm 10,9$ Jahre), bei den Männern 66,4 Jahre ($\pm 14,0$ Jahre).

Bei den NET des *Kolorektums* waren 7 der 13 Patienten weiblich (53,8 %) und 6 männlich (46,2 %). Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis Frauen zu Männern von 1,17:1,0.

Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 40 und 86 Jahren und betrug im Mittel 64,6 Jahre ($\pm 15,9$ Jahre). Bei den Frauen betrug das durchschnittliche Alter 68,3 Jahre ($\pm 19,3$ Jahre), bei den Männern 60,3 Jahre ($\pm 10,7$ Jahre).

Bei den NET des *Pankreas* waren 7 der 10 Patienten weiblich (70 %) und 3 männlich (30 %). Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis Frauen zu Männern von 2,33:1,0. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 43 und 73 Jahren und betrug im Mittel 55,4 Jahre ($\pm 11,8$ Jahre). Bei den Frauen betrug das durchschnittliche Alter 52,6 Jahre ($\pm 9,8$ Jahre), bei den Männern 62,0 Jahre ($\pm 15,7$ Jahre).

Patienten mit einem NET des *Dünndarms* waren zum Zeitpunkt der Operation signifikant älter als Patienten mit einem NET des *Pankreas* ($p < 0,01$).

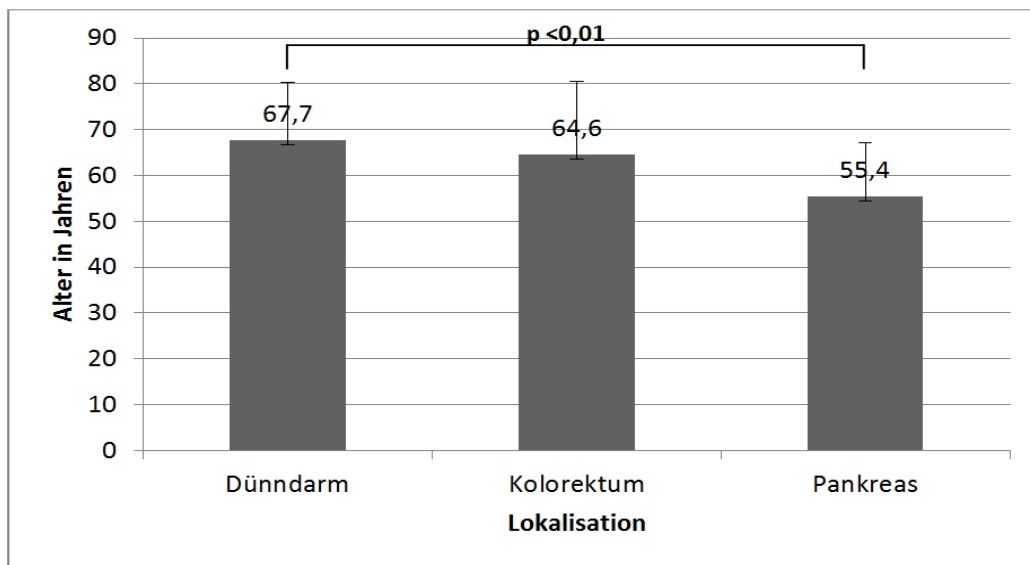
Bei den NET der *WHO-Gruppe 1* waren 8 der 15 Patienten weiblich (53,3 %) und 7 männlich (47,7 %); dies entspricht einem Geschlechterverhältnis Frauen zu Männern von 1,14:1,00. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 40 und 81 Jahren und betrug im Mittel 61,1 Jahre ($\pm 13,2$ Jahre). Bei den Frauen betrug das durchschnittliche Alter 63,8 Jahre ($\pm 14,6$ Jahre), bei den Männern 58,1 Jahre ($\pm 11,8$ Jahre).

Bei den neuroendokrinen Tumoren der *WHO-Gruppe 2* waren 14 der 29 Patienten weiblich (48,3 %) und 15 männlich (51,7 %). Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis Frauen zu Männern von 1,00:1,07. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 43 und 90 Jahren und betrug im Mittel 63,4 Jahre ($\pm 13,9$ Jahre). Bei den Frauen betrug das durchschnittliche Alter 62,6 Jahre ($\pm 14,9$ Jahre), bei den Männern 64,1 Jahre ($\pm 13,4$ Jahre).

Bei den neuroendokrinen Tumoren der *WHO-Gruppe 3* waren 6 der 11 Patienten weiblich (54,5 %) und 5 männlich (45,5 %). Dies entspricht einem Geschlechterverhältnis Frauen zu Männern von 1,20:1,00. Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation lag zwischen 48 und 93 Jahren und betrug im Mittel 73,2 Jahre ($\pm 12,2$ Jahre). Bei den Frauen betrug das durchschnittliche Alter 71,7 Jahre ($\pm 14,4$ Jahre), bei den Männern 75,0 Jahre ($\pm 10,2$ Jahre).

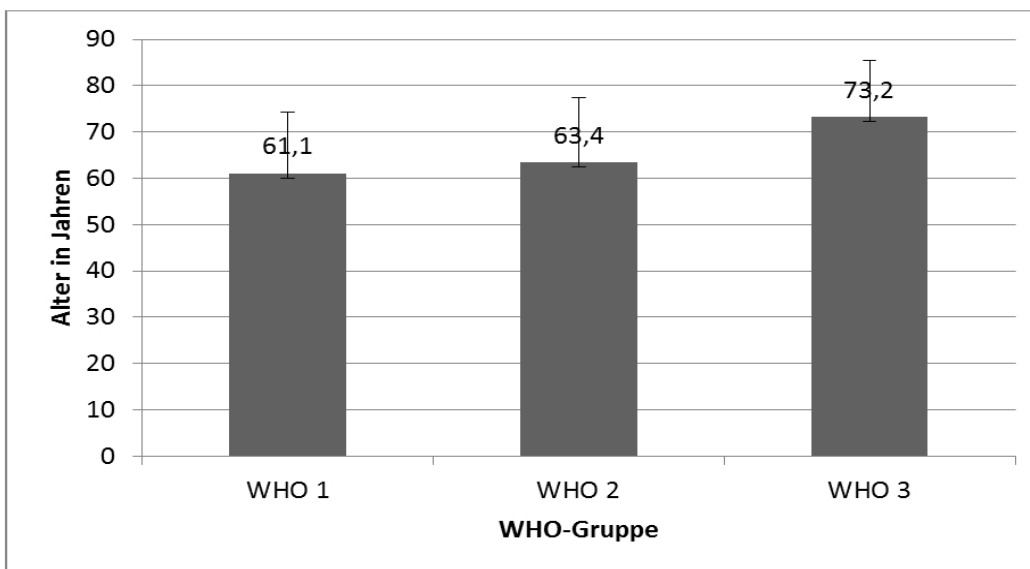
Das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation stieg mit zunehmender WHO-Gruppe tendenziell an. Das durchschnittliche Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation war bei den Tumoren der *WHO-Gruppe 3* in etwa 10 Jahre höher als bei Patienten mit einem NET der *WHO-Gruppen 1 bzw. 2* (siehe Abb. 12).

Abb. 11: Altersverteilung nach Organen



Patienten mit einem NET des *Pankreas* waren zum Zeitpunkt der Operation signifikant jünger als Patienten mit einem NET des *Dünndarms* ($p < 0,01$)

Abb. 12: Altersverteilung nach WHO-Gruppen



Mit zunehmender WHO-Gruppe stieg das Alter der Patienten tendenziell an.

3.2 Histologische Darstellung der Tumoren und des Tumorstromas

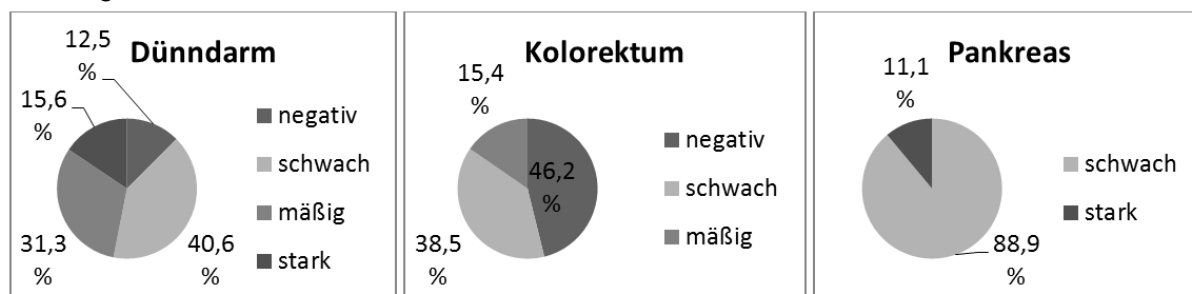
3.2.1 Darstellung der histologischen Tumormarker

3.2.1.1 Chromogranin

Von den insgesamt 54 auswertbaren Präparaten waren 10 Präparate (18,5 %) negativ, 26 Präparate (48,1 %) zeigten eine schwache, 12 Präparate (22,2 %) eine mäßige und 6 Präparate (11,1 %) eine starke Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 12,9 ($\pm 13,8$).

Von den 32 auswertbaren Präparaten des *Dünndarms* waren 4 Präparate (12,5 %) negativ, 13 Präparate (40,6 %) zeigten eine schwache, 10 Präparate (31,3 %) eine mäßige und 5 Präparate (15,6 %) eine starke Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 16,7 ($\pm 14,2$). Von den 13 auswertbaren Präparaten des *Kolorektums* waren 6 Präparate (46,2 %) negativ, 5 Präparate (38,5 %) zeigten eine schwache, 2 Präparate (15,4 %) eine mäßige und kein Präparat (0 %) eine starke Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 4,6 ($\pm 6,2$). Von den 9 auswertbaren Präparaten des *Pankreas* war kein Präparat (0 %) negativ, 8 Präparate (88,9 %) zeigten eine schwache, kein Präparat (0 %) eine mäßige und 1 Präparat (11,1 %) eine starke Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 11,7 ($\pm 16,0$).

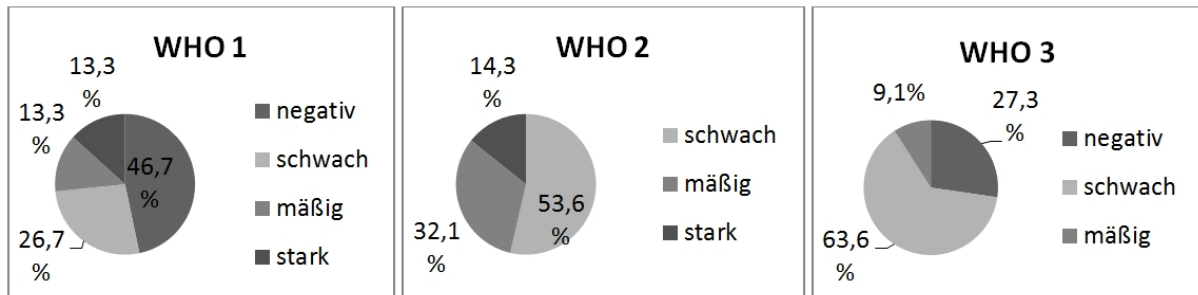
Abb. 13: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der Organlokalisation für Chromogranin



Von den 15 auswertbaren Präparaten der *WHO-Gruppe 1* waren 7 Präparate (46,7 %) negativ, 4 Präparate (26,7 %) zeigten eine schwache, 2 Präparate (13,3 %) eine mäßige und 2 Präparate (13,3 %) eine starke Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 9,2 ($\pm 12,7$). Von den negativen Präparaten stammten 2 Präparate aus dem *Dünndarm* und 5 Präparate aus dem *Kolorektum*. Von den 28 auswertbaren Präparaten der *WHO-Gruppe 2* waren alle Präparate (100 %) positiv, 15 Präparate (53,6 %) zeigten eine schwache, 9 Präparate (32,1 %) eine mäßige und 4 Präparate (14,3 %) eine starke Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 18,2 ($\pm 14,8$). Von den 11 auswertbaren Präparaten der *WHO-Gruppe 3* waren 3 Präparate (27,3 %) negativ, 7 Präparate (63,6 %) zeigten eine schwache, 1 Präparat (9,1 %) eine mäßige und kein Präparat eine starke Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 4,5

(±4,3). Von den negativen Präparaten stammten 2 Präparate aus dem *Dünndarm* und 1 Präparat aus dem *Kolorektum*.

Abb. 14: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der WHO-Gruppe für Chromogranin

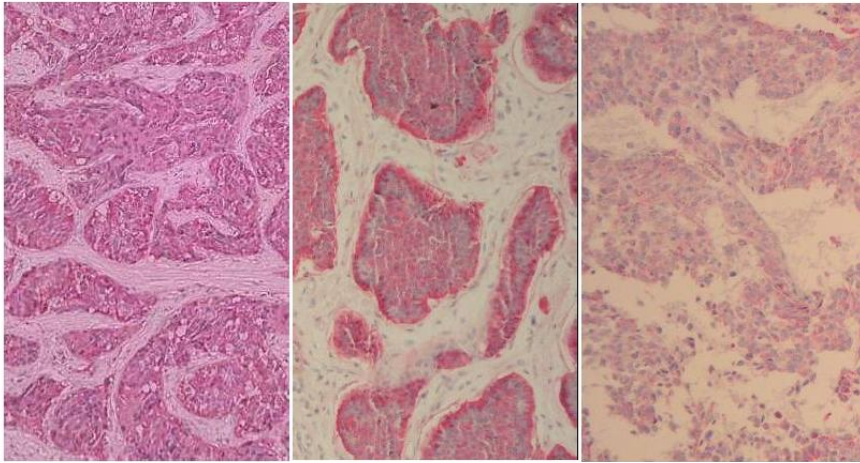


Die Präparate des *Dünndarms* zeigten eine signifikant stärkere Chromograninpositivität im Vergleich zum *Kolorektum* ($p < 0,01$). Der Unterschied der „Scores“ betrug 12,1.

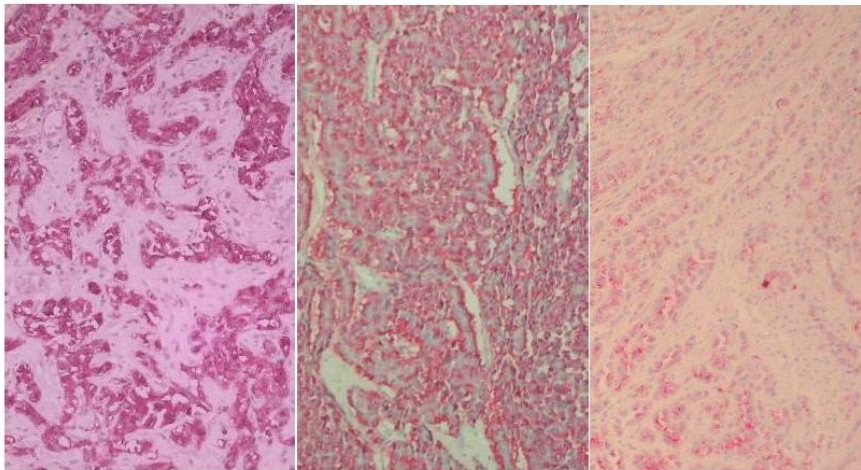
Die Chromograninpositivität nahm in den wenig differenzierten Tumoren der *WHO-Gruppe 3* ab, wobei bei einigen NET der *WHO-Gruppe 3* einzelne Zellnester positiv markiert waren. Der „Score“ war für NET der *WHO-Gruppe 3* signifikant niedriger als für NET der *WHO-Gruppe 2* ($p < 0,01$).

Abb. 15: Chromogranin, repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, 100fache Originalvergrößerung

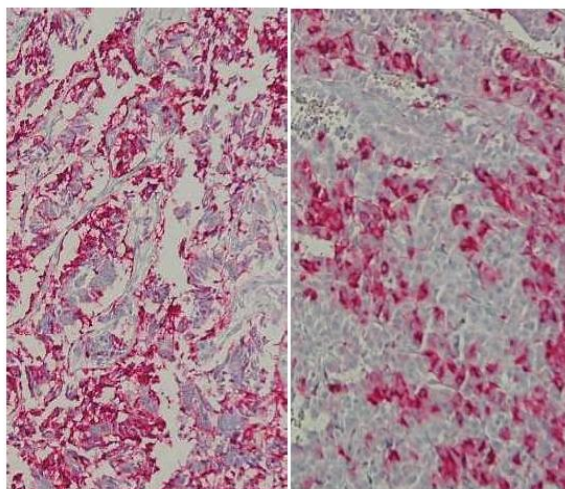
A WHO-Gruppe 1 Dünndarm B WHO-Gruppe 2 Dünndarm C WHO-Gruppe 3 Dünndarm



D WHO-Gruppe 1 Kolorektum E WHO-Gruppe 2 Kolorektum F WHO-Gruppe 3 Kolorektum



G WHO-Gruppe 2 Pankreas H WHO-Gruppe 3 Pankreas



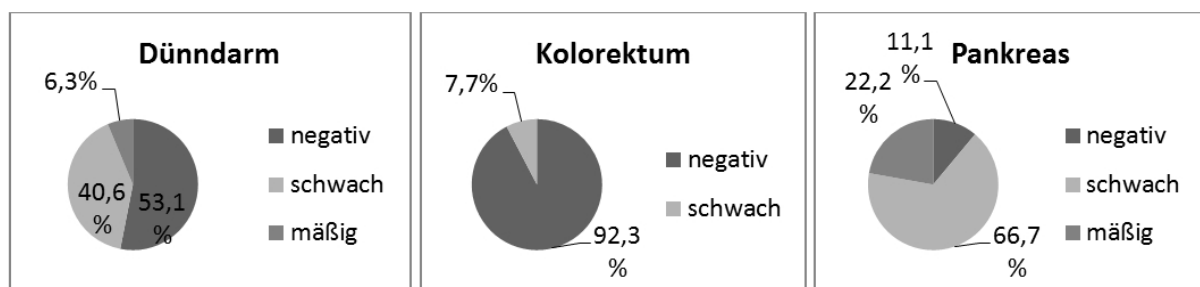
Repräsentative Paraffinschnitte der NET verschiedener Lokalisationen in Hinblick auf die WHO-Gruppen: A-C: Dünndarm, D-F: Kolorektum, G+H: Pankreas; insgesamt ist die abnehmende Chromograninpositivität mit geringerer Differenzierung (WHO-Gruppe 3) charakteristisch/ B: typische palisadenartige Anfärbung, insbesondere am Rand der Tumorzellen/ C, F, H: starke Chromograninpositivität in einzelnen Zellnestern bestehend (H), bei insgesamt deutlicher Heterogenität und schwacher Anfärbung (C+F)

3.2.1.2 CD56/NCAM

Von den insgesamt 54 auswertbaren Präparaten waren 31 Präparate (57,4 %) negativ, 19 Präparate (35,2 %) zeigten eine schwache, 4 Präparate (7,4 %) eine mäßige und kein Präparat (0 %) eine starke Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 3,1 ($\pm 5,4$).

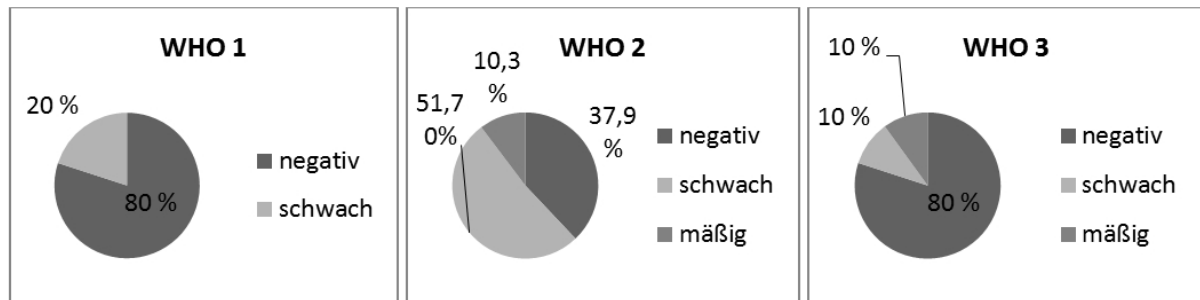
Von den 32 auswertbaren Präparaten des *Dünndarms* waren 17 Präparate (53,1 %) negativ, 13 Präparate (40,6 %) zeigten eine schwache, 2 Präparate (6,3 %) eine mäßige und kein Präparat (0 %) eine starke Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 2,7 ($\pm 4,3$). Von den 13 auswertbaren Präparaten des *Kolorektums* waren 12 Präparate (92,3 %) negativ, 1 Präparat (7,7 %) zeigte eine schwache, kein Präparat (0 %) eine mäßige und kein Präparat (0 %) eine starke Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 0,8 ($\pm 2,2$). Von den 9 auswertbaren Präparaten des *Pankreas* war 1 Präparat (11,1 %) negativ, 6 Präparate (66,7 %) zeigten eine schwache, 2 Präparate (22,2 %) eine mäßige und kein Präparat (0 %) eine starke Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 7,6 ($\pm 9,0$).

Abb. 16: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der Organlokalisierung für CD56



Von den 15 auswertbaren Präparaten der *WHO-Gruppe 1* waren 12 Präparate (80 %) negativ, 3 Präparate (20 %) zeigten eine schwache, kein Präparat (0 %) eine mäßige und kein Präparat (0 %) eine starke Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 1,4 ($\pm 3,8$). Von den 29 auswertbaren Präparaten der *WHO-Gruppe 2* waren 11 Präparate (37,9 %) negativ, 15 Präparate (51,7 %) zeigten eine schwache, 3 Präparate (10,3 %) eine mäßige und kein Präparat (0 %) eine starke Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 4,0 ($\pm 5,6$). Von den 10 auswertbaren Präparaten der *WHO-Gruppe 3* waren 8 Präparate (80 %) negativ, 1 Präparat (10 %) zeigte eine schwache, 1 Präparat (10 %) eine mäßige und kein Präparat eine starke Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 2,9 ($\pm 6,7$).

Abb. 17: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der WHO-Gruppe für CD56



CD56/NCAM zeigte nur in ungefähr der Hälfte der Präparate eine Positivität. Vernachlässigbar war CD56/NCAM in den NET des *Kolorektums*. Tendenziell wiesen die NET des *Pankreas* einen höheren „Score“ auf als die NET des *Dünndarms* und *Kolorektums*. CD56 stellte sich kaum in den NET der *WHO-Gruppe 1 und 3* dar. Zu etwa 60% war eine Positivität in den Präparaten der *WHO-Gruppe 2* detektierbar.

Interessanterweise nahm mit zunehmender Tumorgröße der CD56-„Score“ signifikant zu ($p < 0,01$).

CD56/NCAM gilt auch als Marker für natürliche Killerzellen. In den gastrointestinalen NET wurden einzelne Zellen angefärbt, bei denen es sich um natürliche Killerzellen handeln könnte. Die Anzahl von einzelnen CD56-positiven Zellen im Tumorstroma war jedoch sehr gering. Eine exakte Quantifizierung mittels Computeranalyse wurde nicht durchgeführt.

Abb. 18: Beispiel für CD56 als Marker für Tumorzellen, Dünndarm, 100fache Originalvergrößerung

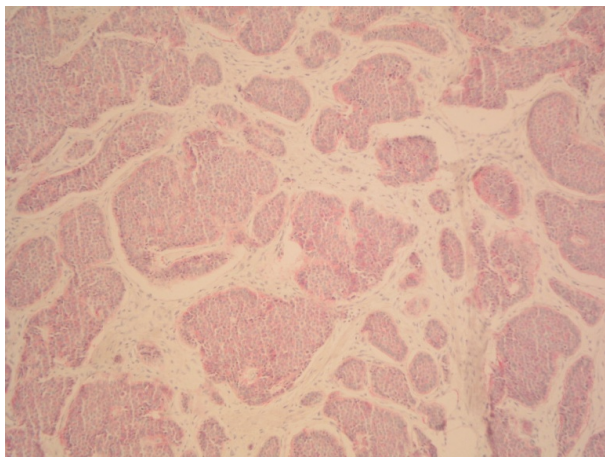


Abb. 19: Beispiel für CD56 als Marker für NK-Zellen (seltenes Bild), Kolorektum, 100fache Originalvergrößerung

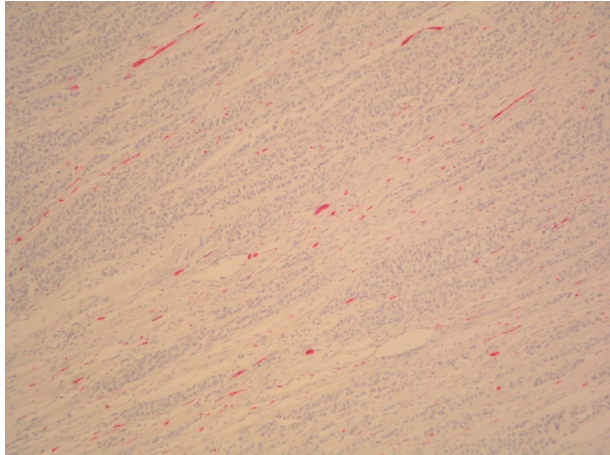
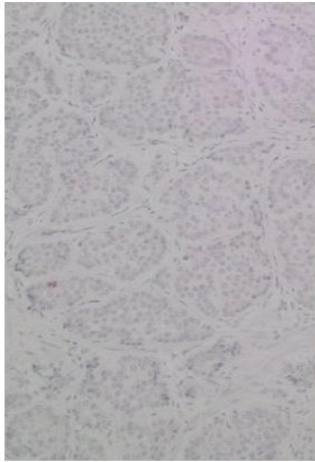
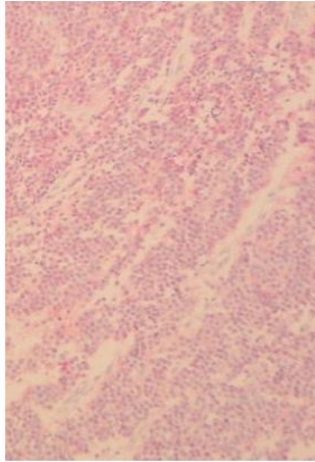


Abb. 20: CD56/NCAM, repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, 100fache Originalvergrößerung

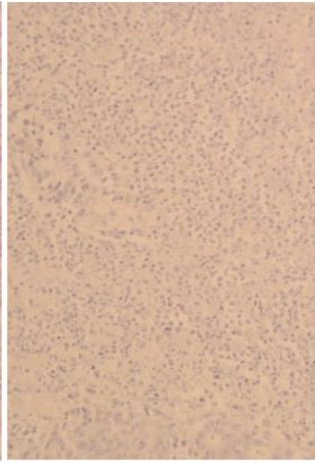
A WHO-Gruppe 1 Dünndarm



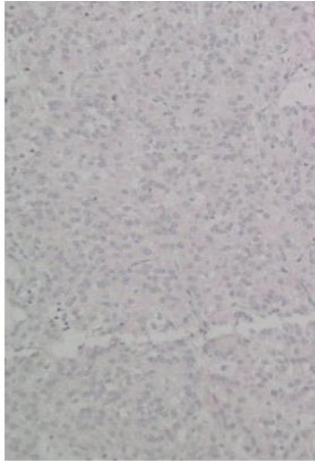
B WHO-Gruppe 2 Dünndarm



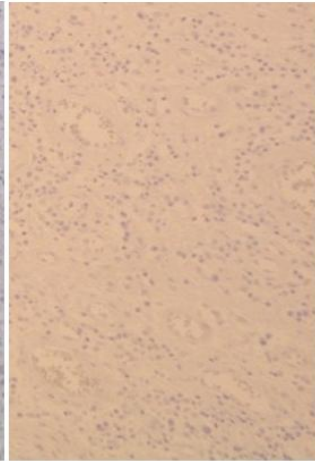
C WHO-Gruppe 3 Dünndarm



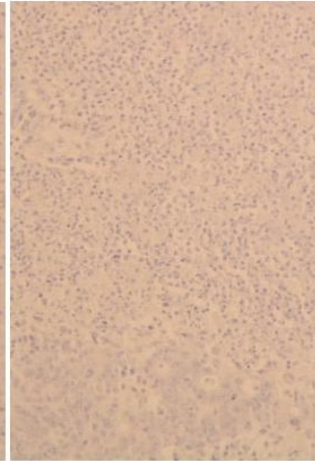
D WHO-Gruppe 1 Kolorektum



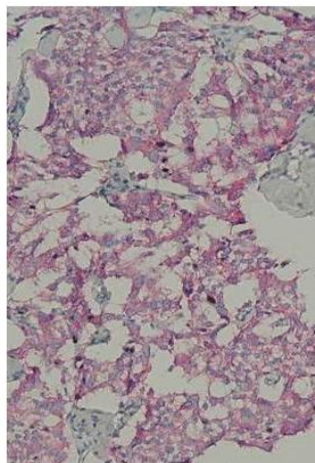
E WHO-Gruppe 2 Kolorektum



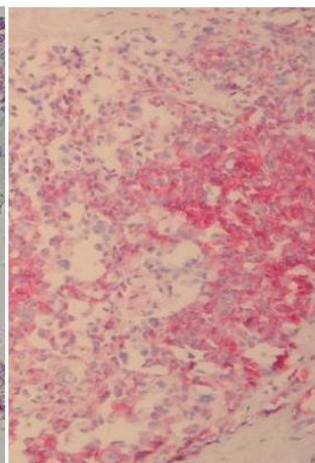
F WHO-Gruppe 3 Kolorektum



G WHO-Gruppe 2 Pankreas



H WHO-Gruppe 3 Pankreas



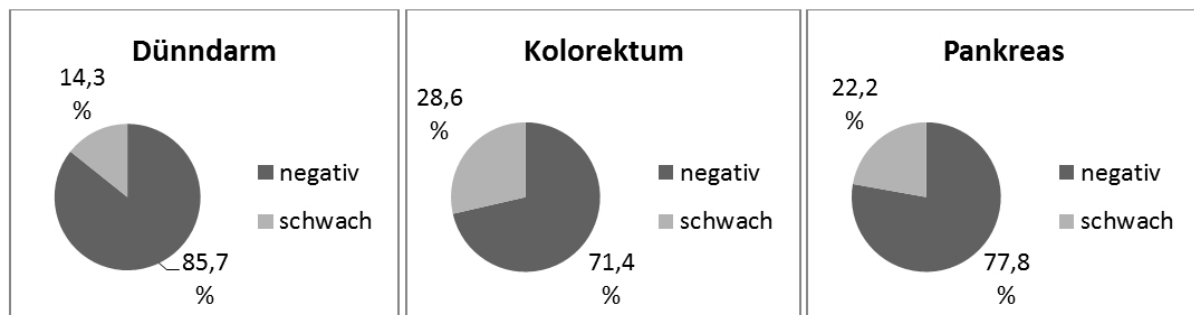
Repräsentative Paraffinschnitte der NET verschiedener Lokalisationen in Hinblick auf die WHO-Gruppen: A-C: Dünndarm, D-F: Kolorektum, G+H: Pankreas; überwiegend negative bzw. schwache Färbung mit stärkerer Positivität im Pankreas (G+H) und schwacher Positivität in WHO-Gruppe 2 des Dünndarms (B); Kolorektum negativ (D-F)

3.2.1.3 S100

Von den insgesamt 37 auswertbaren Präparaten waren 30 Präparate (81,1 %) negativ, 7 Präparate (18,9 %) zeigten eine schwache, kein Präparat (0 %) eine mäßige und kein Präparat (0 %) eine starke Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 0,8 ($\pm 2,2$).

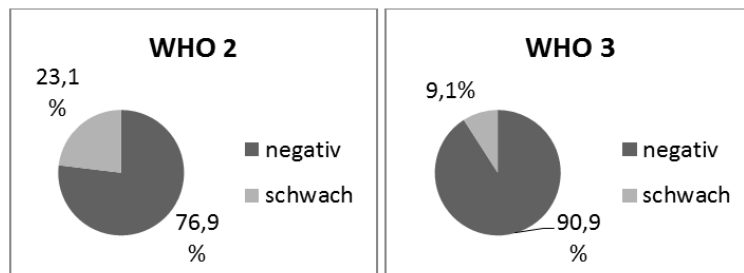
Von den 21 auswertbaren Präparaten des *Dünndarms* waren 18 Präparate (85,7 %) negativ; 3 Präparate (14,3 %) zeigten eine schwache Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 1,0 ($\pm 2,9$). Von den 7 auswertbaren Präparaten des *Kolorektums* waren 5 Präparate (71,4 %) negativ; 2 Präparate (28,6 %) zeigten eine schwache Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 0,6 ($\pm 0,6$). Von den 9 auswertbaren Präparaten des *Pankreas* waren 7 Präparate (77,8 %) negativ; 2 Präparate (22,2 %) zeigten eine schwache Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 0,6 ($\pm 0,9$).

Abb. 21: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der Organlokalisierung für S100



Von den 26 auswertbaren Präparaten der *WHO-Gruppe 2* waren 20 Präparate (76,9 %) negativ; 6 Präparate (23,1 %) zeigten eine schwache Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 1,0 ($\pm 2,6$). Von den 11 auswertbaren Präparaten der *WHO-Gruppe 3* waren 10 Präparate (90,9 %) negativ, 1 Präparat (9,1 %) zeigte eine schwache Färbung. Der durchschnittliche „Score“ betrug 0,3 ($\pm 0,4$). Daten für NET der *WHO-Gruppe 1* lagen nicht vor.

Abb. 22: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der WHO-Gruppe für S100



S100 stellte sich als Tumormarker in allen Organen bzw. WHO-Gruppen mit vernachlässigbarer, inhomogener Positivität dar. S100 kann bei >80 % negativen Präparaten nicht als adäquater Tumormarker betrachtet werden, wobei für NET der *WHO-Gruppe 1* keine Daten vorlagen.

S100-positive Zellen ließen sich jedoch in allen drei Organsystemen als einzelne Zellen im Tumorstroma darstellen. Dabei zeigten die Zellen die für dendritische Zellen typischen Ausläufer. Da S100 ebenfalls als Tumormarker für neuroendokrine Karzinome beschrieben wurde (Al-Khafaji et al. 1998), wurde darauf verzichtet, die S100-positiven Zellen quantitativ darzustellen.

Abb. 23: Beispiel für S100 als Marker für dendritische Zellen im Tumorstroma (seltenes Bild in Bezug auf die große Anzahl positiver Zellen), Pankreas, 100fache Originalvergrößerung

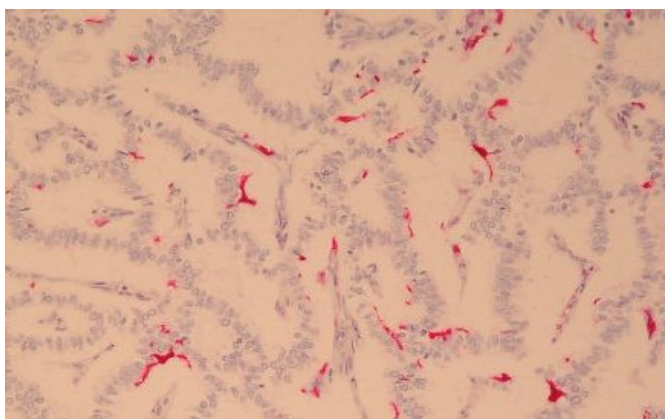
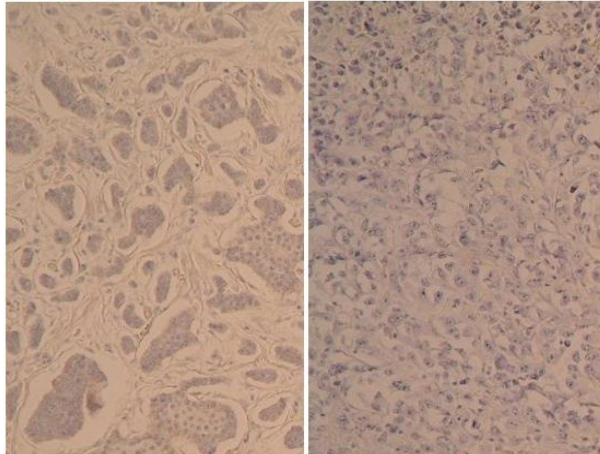
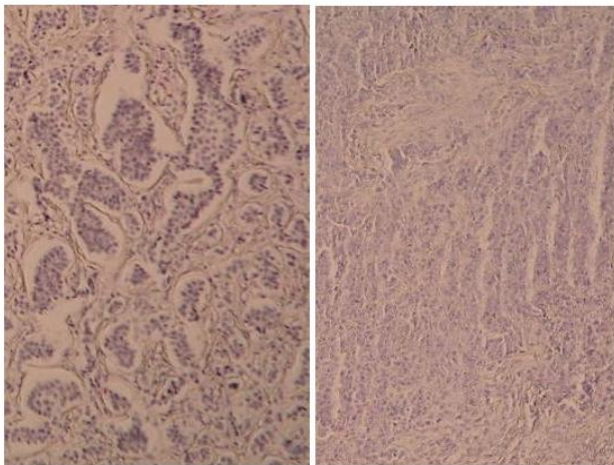


Abb. 24: S100, repräsentative Darstellung, 100fache Vergrößerung.

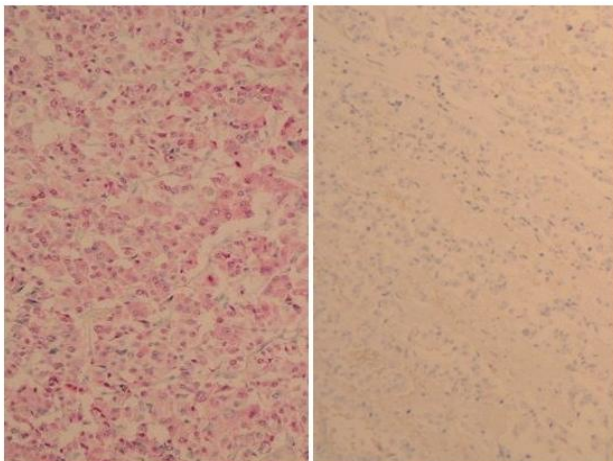
| A WHO-Gruppe 2 Dünndarm B WHO-Gruppe 3 Dünndarm



C WHO-Gruppe 2 Kolorektum D WHO-Gruppe 3 Kolorektum



E WHO-Gruppe 2 Pankreas F WHO-Gruppe 3 Pankreas



Repräsentative Paraffinschnitte der NET verschiedener Lokalisationen in Hinblick auf die WHO-Gruppen: A+B: Dünndarm, C+D: Kolorektum, E+F: Pankreas; überwiegend negative Färbung mit vereinzelter Positivität in WHO-Gruppe 2 des Pankreas (E); S100 kann nicht als adäquater Tumormarker betrachtet werden.

3.2.2 Darstellung der histologischen Wachstumsmuster

Von den insgesamt 55 Präparaten zeigten 22 Präparate (40 %) ein insuläres, 12 Präparate (21,8 %) ein azinäres, 13 Präparate (23,6 %) ein trabekuläres, 5 Präparate (9,1 %) ein diffuses und 3 Präparate (5,5 %) ein gemischt insulär-azinäres histologisches Wachstumsmuster.

Von den 32 Präparaten des *Dünndarms* zeigten 19 Präparate (59,4 %) ein insuläres, 5 Präparate (15,6 %) ein azinäres, 2 Präparate (6,3 %) ein trabekuläres, 3 Präparate (9,4 %) ein diffuses und 3 Präparate (9,4 %) ein gemischt insulär-azinäres histologisches Wachstumsmuster. Von den 13 Präparaten des *Kolorektums* zeigte 1 Präparat (7,7 %) ein insuläres histologisches Wachstumsmuster, 3 Präparate (23,1 %) zeigten ein azinäres, 7 Präparate (53,8 %) ein trabekuläres, 2 Präparate (15,4 %) ein diffuses und kein Präparat (0 %) ein gemischt insulär-azinäres histologisches Wachstumsmuster. Von den 10 Präparaten des *Pankreas* zeigten 2 Präparate (20 %) ein insuläres, 4 Präparate (40 %) ein azinäres, 4 Präparate (40 %) ein trabekuläres, kein Präparat (0 %) ein diffuses und kein Präparat (0 %) ein gemischt insulär-azinäres histologisches Wachstumsmuster.

Von den 15 Präparaten der *WHO-Gruppe 1* zeigten 3 Präparate (20 %) ein insuläres, 3 Präparate (20 %) ein azinäres, 6 Präparate (40 %) ein trabekuläres, kein Präparat (0 %) ein diffuses und 3 Präparate (20 %) ein gemischt insulär-azinäres histologisches Wachstumsmuster. Von den 29 Präparaten der *WHO-Gruppe 2* zeigten 18 Präparate (62,1 %) ein insuläres, 5 Präparate (17,2 %) ein azinäres, 6 Präparate (20,7 %) ein trabekuläres, kein Präparat (0 %) ein diffuses und kein Präparat (0 %) ein gemischt insulär-azinäres histologisches Wachstumsmuster. Von den 11 Präparaten der *WHO-Gruppe 3* zeigte 1 Präparat (9,1 %) ein insuläres histologisches Wachstumsmuster, 4 Präparate (36,4 %) zeigten ein azinäres, 1 Präparat (9,1 %) ein trabekuläres, 5 Präparate (45,5 %) ein diffuses und kein Präparat (0 %) ein gemischt insulär-azinäres histologisches Wachstumsmuster.

Abb. 25: Verteilung aller NET in Abhängigkeit des histologischen Wachstumsmusters

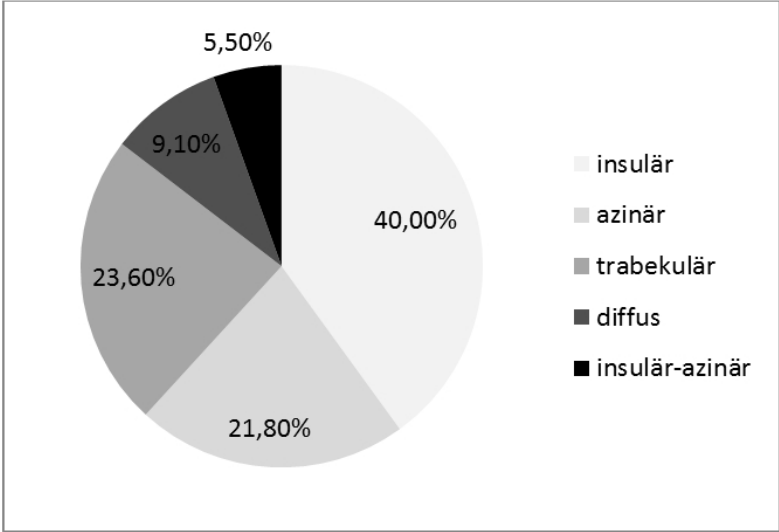


Abb. 26: Beispiel für insuläres Wachstumsmuster, Dünndarm, 100fache Originalvergrößerung

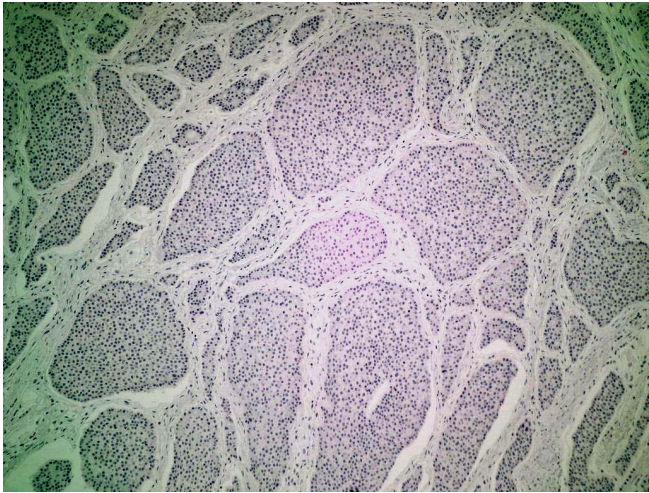


Abb. 27: Beispiel für azinäres Wachstumsmuster, Dünndarm, 100fache Originalvergrößerung

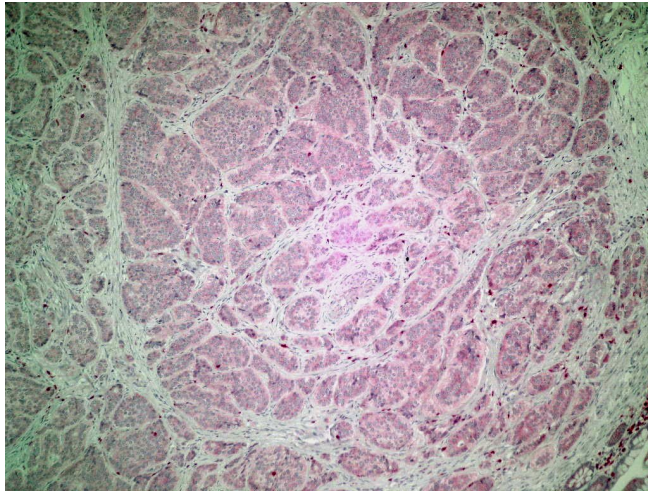


Abb. 28: Beispiel für trabekuläres Wachstumsmuster, Dünndarm, 100fache Originalvergrößerung

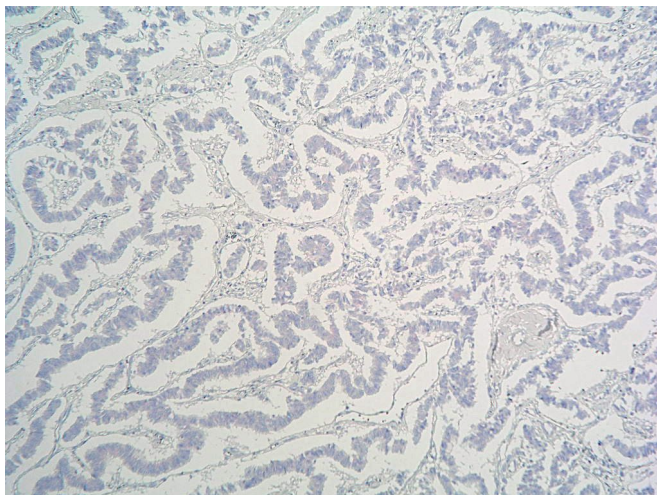
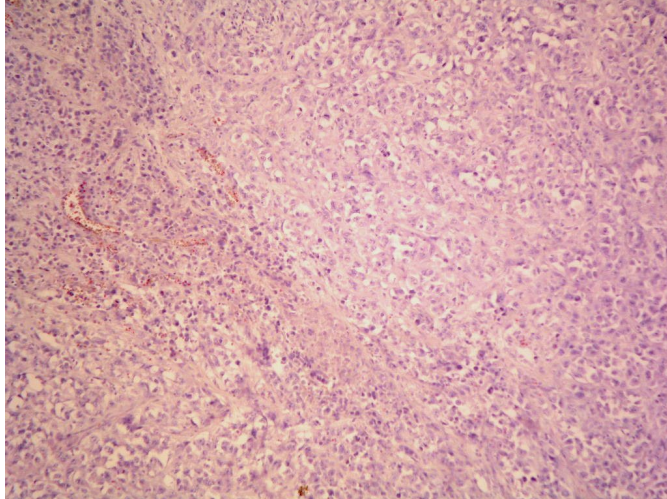


Abb. 29: Beispiel für diffuses Wachstumsmuster, Dünndarm, 100fache Originalvergrößerung



3.2.3 Darstellung der Tumorstromamarker

3.2.3.1 Bestandteile des Tumorstromas

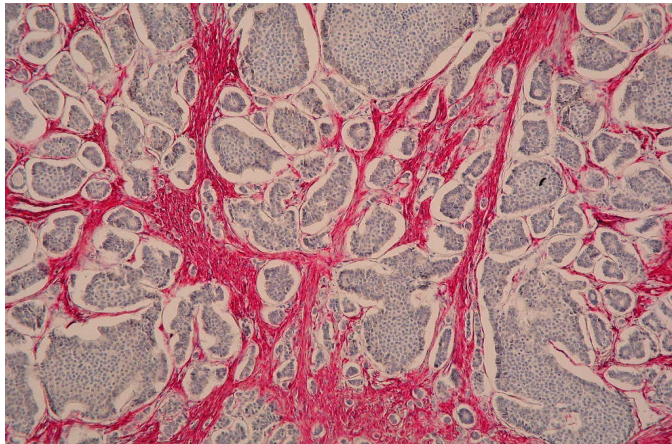
Zum Tumorstroma gehören Muskel-, Gefäß-, und Bindegewebszellen, die das Gerüst für den Tumor bilden und für die Ernährung und das Wachstum des Tumors eine Rolle spielen. Die verwendeten Marker dienen dazu, Kenntnisse über die Zusammensetzung des Tumorstromas der NET zu erhalten. Das Tumorstroma bei neuroendokrinen Tumoren bildet in der Regel Septen-ähnliche Formationen um die Tumorzellnester.

3.2.3.2 α -SMA

Von den insgesamt 38 auswertbaren Präparaten war in allen Präparaten (100 %) eine Antikörperpositivität im Stroma detektierbar. Von den 38 auswertbaren Präparaten ließen sich 27 Präparate der *WHO-Gruppe 2* und 11 Präparate der *WHO-Gruppe 3* zuordnen. Angefärbt wurde das Muskelgewebe zwischen den Tumorzellen. Die Tumorzellen wurden nicht gefärbt.

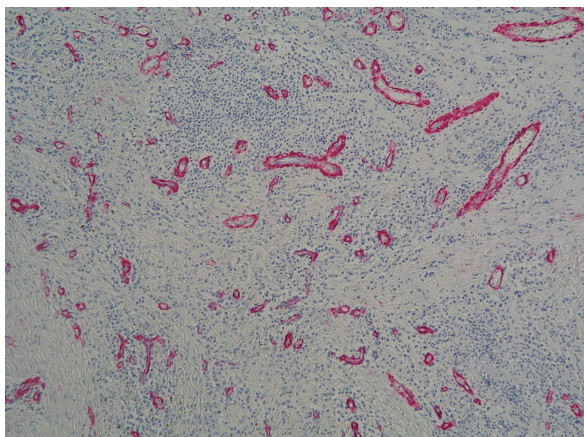
Im *Dünndarm* zeigte das Stroma in 17 von 21 Präparaten (80,1 %) kräftig gefärbte, breite und lange Aktinbündel. Die Bündel waren um die Tumorzellnester angeordnet. 2 von 21 Präparaten (9,5 %) zeigten schwach gefärbte, breite und lange Aktinbündel. 2 von 21 Präparaten (9,5 %) zeigten schmale, kurze und unregelmäßige Aktinbündel. Bei den beiden Präparaten handelte es sich um NET der *WHO-Gruppe 3*.

Abb. 30: Beispiel für die überwiegend kräftig gefärbten, breiten und langen Aktinbündel im Dünndarm, 100fache Originalvergrößerung



Im *Kolorektum* zeigte das Stroma in 3 von 7 Präparaten (42,9 %) kräftig gefärbte, breite und lange Aktinbündel. 2 von 7 Präparaten (28,6 %) zeigten schmale, kurze und unregelmäßige Aktinbündel. Bei den beiden Präparaten handelte es sich um NET der *WHO-Gruppe 3*. Bei 2 von 7 Präparaten (28,6 %) war vorwiegend das Bindegewebe in den Gefäßen angefärbt worden.

Abb. 31: Beispiel für die Anfärbung von Gefäßen im Kolorektum, 100fache Originalvergrößerung



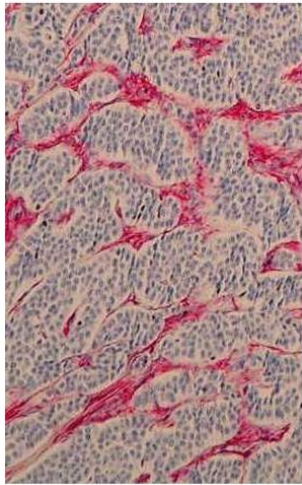
Die α -SMA-Positivität im Stroma der NET des *Pankreas* war unregelmäßiger im Vergleich zu NET des *Dünndarms*. In den Präparaten war das Stroma in einigen Abschnitten komplett und deutlich gefärbt, in einigen Abschnitten nur inkomplett. Einige Stellen zeigten eine nur schwach positive Färbung. In einem Präparat waren vorwiegend die Gefäße gefärbt.

In allen drei Organlokalisationen wurden die Tumorzellen nicht angefärbt, sondern ausschließlich das Bindegewebe in den Septen zwischen den Tumorzellkomplexen.

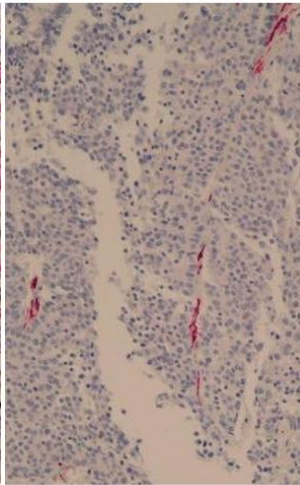
Die Aktinbündel in den Tumoren der *WHO-Gruppe 2* stellten sich überwiegend breit und lang gezogen dar. Sie füllten das gesamte Bindegewebe zwischen den Tumorzellnestern aus. In den Tumoren der *WHO-Gruppe 3* waren die Aktinbündel deutlich schmaler, kürzer und unregelmäßiger bei gleichzeitig verkleinertem Tumorstroma.

Abb. 32: α -SMA, repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, 100fache Vergrößerung

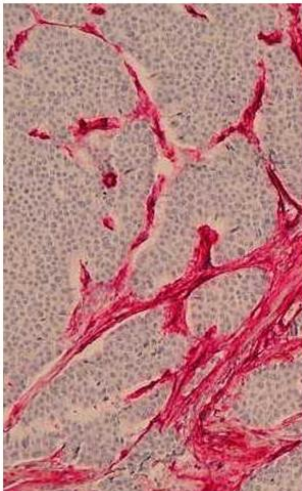
A WHO-Gruppe 2 Dünndarm



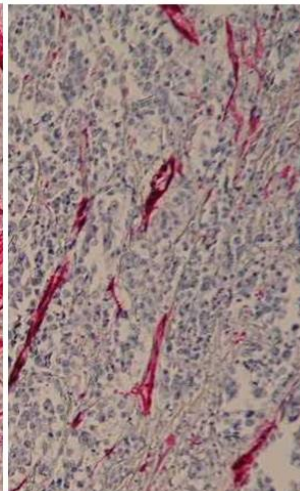
B WHO-Gruppe 3 Dünndarm



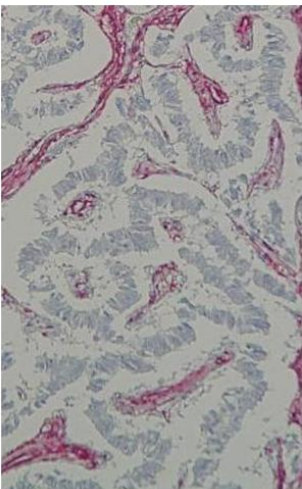
C WHO-Gruppe 2 Kolorektum



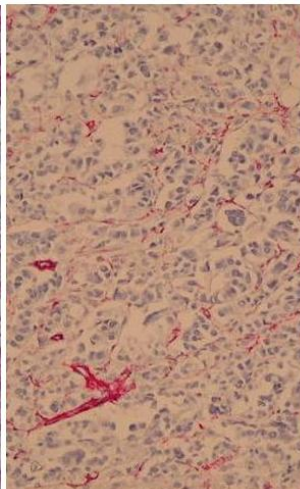
D WHO-Gruppe 3 Kolorektum



E WHO-Gruppe 2 Pankreas



F WHO-Gruppe 3 Pankreas



Repräsentative Paraffinschnitte der NET verschiedener Lokalisationen in Hinblick auf die WHO-Gruppen: A+B: Dünndarm, C+D: Kolorektum, E+F: Pankreas; α -SMA-Bündel im Stroma aller Präparate nachweisbar; Tumoren der WHO-Gruppe 2 zeigen breite und lange Stränge (A, C, E); in Tumoren der WHO-Gruppe 3 sind die Stränge schmal und kurz (B, D, F) bei gleichzeitig verkleinertem Tumorstroma

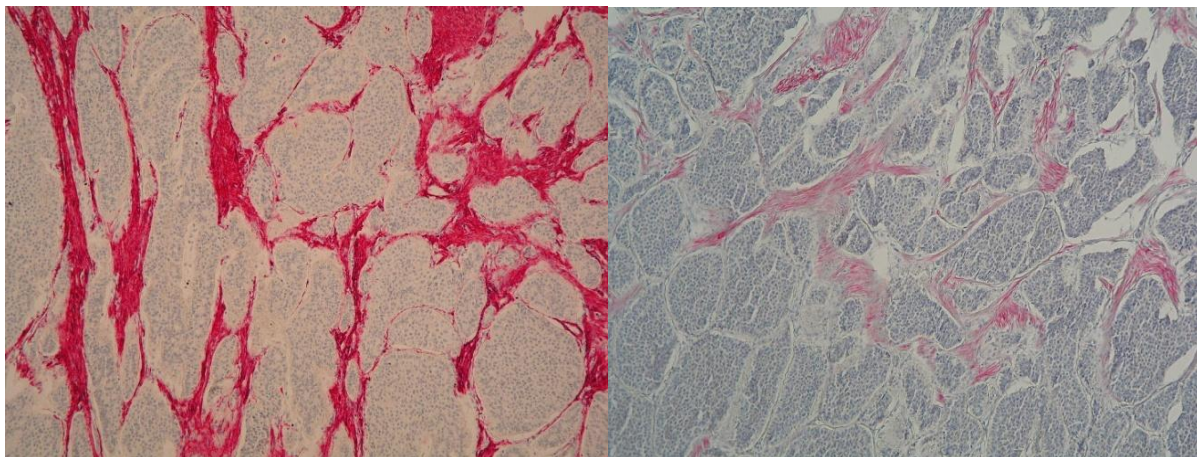
3.2.3.3 Desmin

Von den insgesamt 37 auswertbaren Präparaten war in 15 Präparaten (40,5 %) eine Antikörperpositivität im Stroma detektierbar. Von den 20 auswertbaren Präparaten des *Dünndarms* war in 14 Präparaten (70 %) eine Positivität im Stroma erkennbar, 1 von 7 auswertbaren Präparaten (14,3 %) im *Kolorektum* zeigte eine Positivität. Im *Pankreas* war von 10 auswertbaren Präparaten kein Präparat (0 %) für den Antikörper positiv.

Von den insgesamt 26 auswertbaren Präparaten der *WHO-Gruppe 2* war in 13 Präparaten (50 %) eine Antikörperpositivität im Stroma detektierbar. Von den 11 auswertbaren Präparaten der *WHO-Gruppe 3* war in 2 Präparaten (18,2 %) eine Positivität im Stroma erkennbar.

Im *Dünndarm* zeigte deutlich mehr als die Hälfte der Präparate eine Färbung im Tumorstroma. Die Färbung war jedoch nicht an allen Stellen des Tumorstromas nachzuweisen. Während im *Dünndarm* einige Bereiche bzw. Präparate nur schwach positive Areale zeigten, stellten sich einige Bereiche deutlich positiv dar. Im Vergleich zur Aktinfärbung waren die angefärbten Stränge schmaler, unregelmäßiger und weniger stark gefärbt.

Abb. 33: Beispiel für die unterschiedliche Ausprägung der Färbung von Aktin und Desmin im Dünndarm (links: Aktin, rechts Desmin, selbes Präparat), 100fache Originalvergrößerung

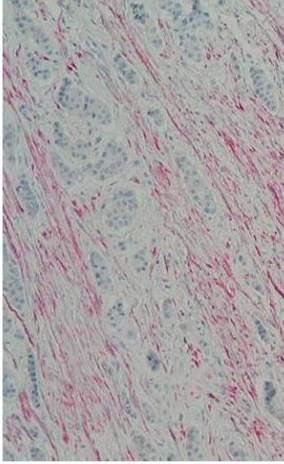


Ein anderes Bild ergab sich bei den Präparaten des *Kolorektums* und *Pankreas*. Im *Kolorektum* war ein Präparat positiv; im *Pankreas* war in keinem Präparat eine Positivität zu detektieren. Ein Präparat des *Kolorektums* zeigte eine schwache Anfärbung der Tumorzellen. Bei dem Tumor handelte es sich um einen G2-Tumor mit hohem Ki-67-Proliferationsindex (17,8 %).

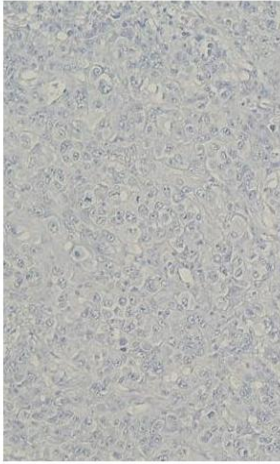
Die Präparate der *WHO-Gruppe 2* waren zur Hälfte positiv. Die Präparate der *WHO-Gruppe 3* zeigten bei einem deutlich schmaleren Tumorstroma nur vereinzelt schmale, positive Stränge zwischen den Tumorzellkomplexen. Das Stroma war in den Präparaten der *WHO-Gruppe 3* überwiegend negativ für Desmin.

Abb. 34: Desmin, repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, 100fache Originalvergrößerung

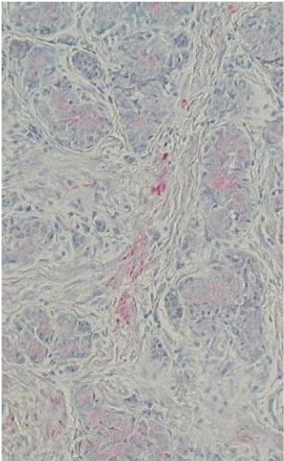
A WHO-Gruppe 2 Dünndarm



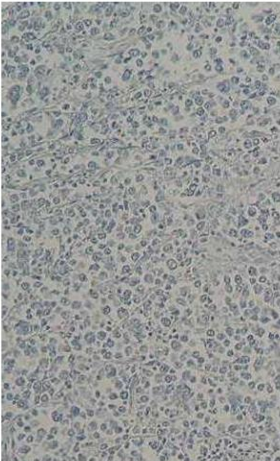
B WHO-Gruppe 3 Dünndarm



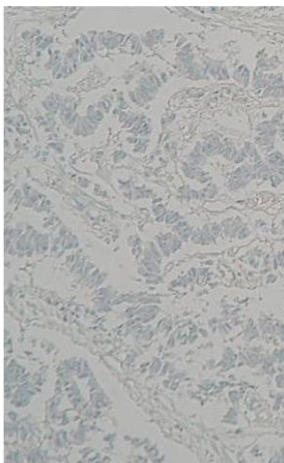
C WHO-Gruppe 2 Kolorektum



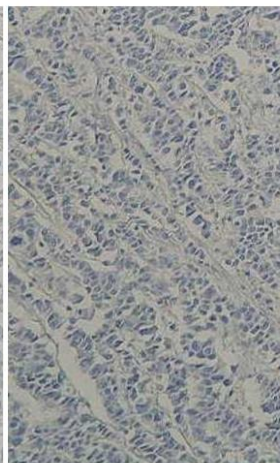
D WHO-Gruppe 3 Kolorektum



E WHO-Gruppe 2 Pankreas



F WHO-Gruppe 3 Pankreas



Repräsentative Paraffinschnitte der NET verschiedener Lokalisationen in Hinblick auf die WHO-Gruppen: A+B: Dünndarm, C+D: Kolorektum, E+F: Pankreas; überwiegend negative Färbung; schmale positive Stränge in WHO-Gruppe 2 des Dünndarms (A)

3.2.3.4 Fascin

In allen der 38 auswertbaren Präparate wurden Gefäße und Zellen im Tumorstroma mit z.T. dendritischer Zellmorphologie angefärbt. 4 von 38 Präparaten (10,5 %) zeigten zusätzlich eine Positivität der Tumorzellen. Von den 4 Präparaten stammten 2 aus dem *Dünndarm* und 2 aus dem *Kolorektum*. Die 4 Präparate mit positiven Tumorzellen gehörten zu den Tumoren der *WHO-Gruppe 3*.

Von den auswertbaren Präparaten stammten 21 Präparate aus dem *Dünndarm*, 7 aus dem *Kolorektum* und 10 aus dem *Pankreas*. Von den 38 Präparaten ließen sich 27 Präparate der *WHO-Gruppe 2* und 11 Präparate der *WHO-Gruppe 3* zuordnen.

Die Fascin-Färbung präsentierte sich insgesamt eher heterogen. Im *Dünndarm* ergab sich das typische Bild, dass in erster Linie Wände kleinerer Gefäße von dem Antikörper angefärbt wurden. Darüber hinaus waren jedoch zwischen den angefärbten Gefäßen in vielen Fällen Antikörper-markierte Zellen zu detektieren. Einige Zellen zeigten die für dendritische Zellen typischen Ausläufer. Im Vergleich zur Kim1p-Färbung waren die Zellen mit Ausläufern seltener zu detektieren.

Im *Kolorektum* präsentierte sich die Färbung heterogener. In allen Präparaten zeigte sich eine deutliche Positivität der Antikörper-Färbung in einzelnen Zellen des Stromas. In zwei Präparaten waren die positiven Tumorzellen kaum abgrenzbar von den gefärbten Stromazellen. Hier zeigte sich ein diffuses Zellbild.

Die Färbung im *Pankreas* stellte sich homogener als die Färbung im *Kolorektum* dar. Die Gefäßwände waren deutlich und regelmäßig angefärbt. Zellen im Stroma waren detektierbar. Vereinzelt waren im Stroma Zellen mit kleinen Ausläufern zu erkennen. In keinem Präparat zeigten die Tumorzellen eine Positivität. Ein Präparat zeigte eine diffuse Färbung ohne klare Darstellung der Gefäße im Tumorstroma.

Die Präparate der *WHO-Gruppe 2* zeigten regelmäßig gefärbte Zellen im Tumorstroma zwischen den Tumorzellkomplexen. Es waren sowohl Gefäßwände, als auch kleinere runde Zellen, teils mit den für dendritische Zellen typischen Ausläufern, zu erkennen. Die Präparate der *WHO-Gruppe 3* stellten sich heterogen dar. Die Präparate, in denen die Tumorzellen positiv waren, zeigten ein diffuses Zellbild mit geringer Abgrenzung von Tumor- und Stromazellen bei insgesamt geringem Stroma-Anteil. Bei zwei Präparaten war das Stroma deutlich von den Tumorzellen abgrenzbar. Hier zeigten sich sowohl positive Gefäßwände als auch runde, plumpe Zellen. Vereinzelt waren Zellen mit kleinen Zellausläufern erkennbar.

Abb. 35: Beispiel für Fascin als Marker für dendritische Zellen und Gefäße, Pankreas, 100fache Originalvergrößerung

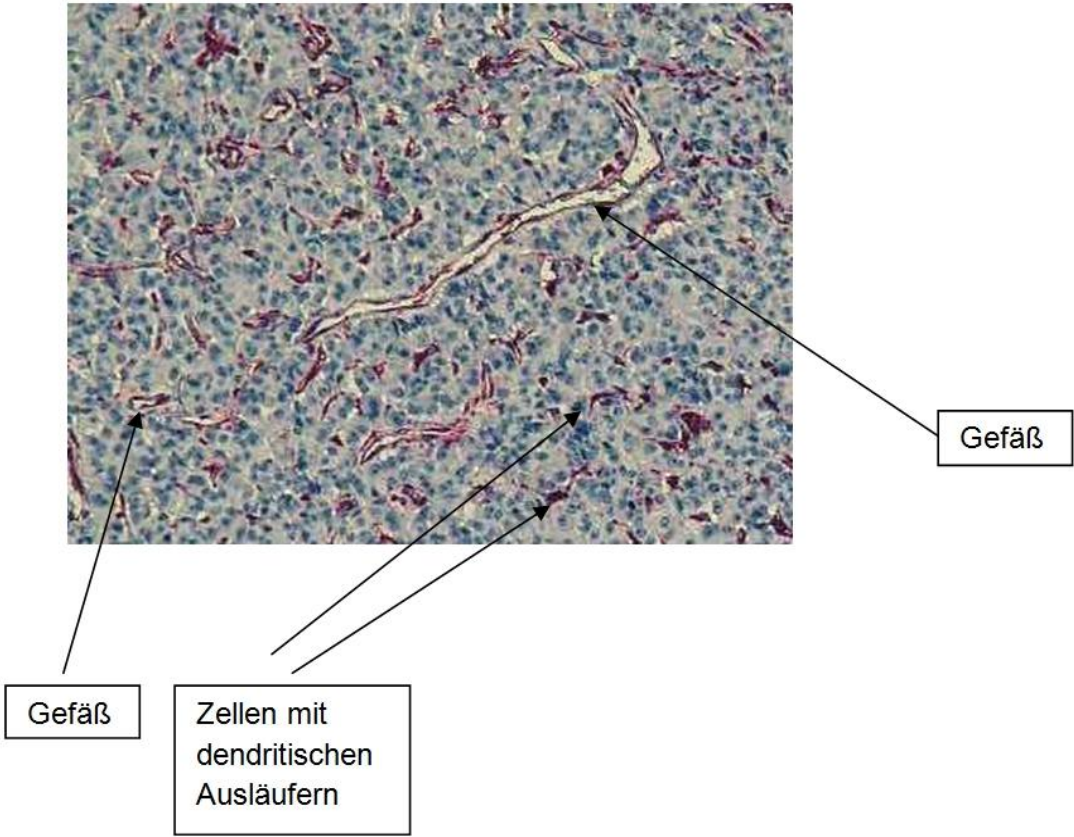


Abb. 36: Beispiel für Fascin als Marker für Tumorzellen, Dünndarm, 100fache Originalvergrößerung

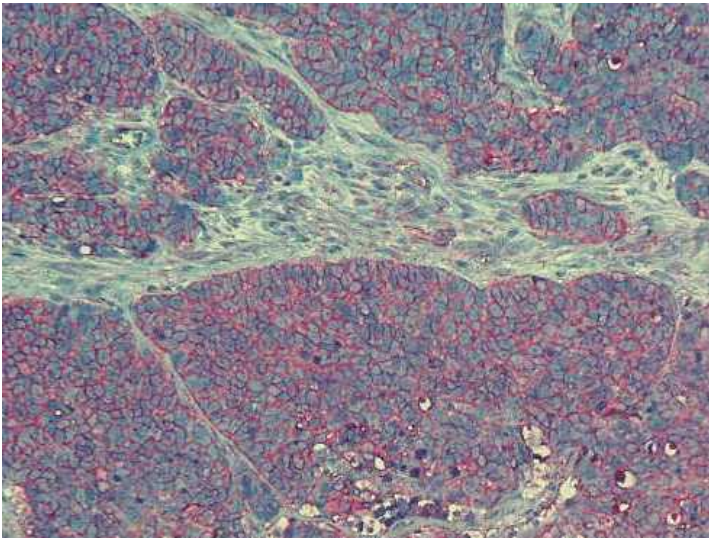
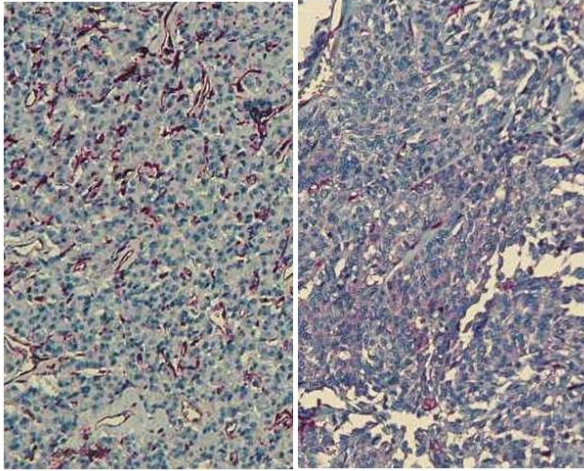


Abb. 37: Fascin, Repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, 100fache Original-vergrößerung

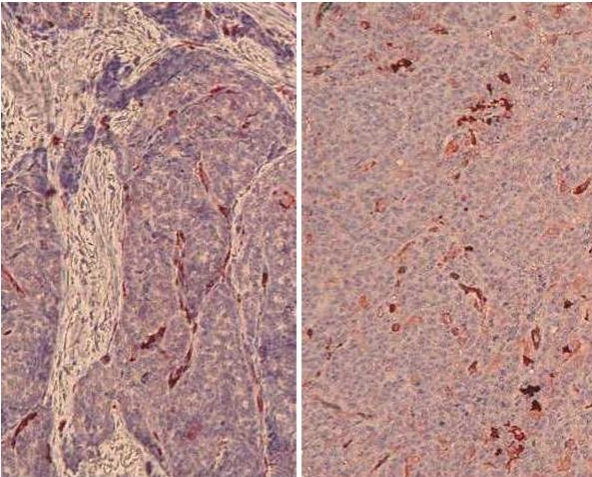
A WHO-Gruppe 2 Dünndarm

B WHO-Gruppe 3 Dünndarm



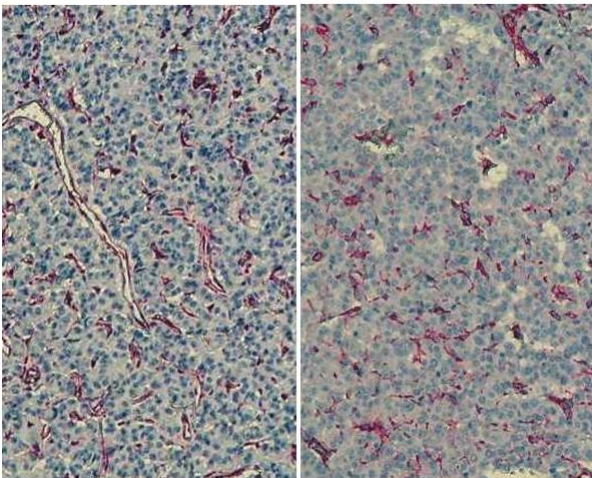
C WHO-Gruppe 2 Kolorektum

D WHO-Gruppe 3 Kolorektum



E WHO-Gruppe 2 Pankreas

F WHO-Gruppe 3 Pankreas



Repräsentative Paraffinschnitte der NET verschiedener Lokalisationen in Hinblick auf die WHO-Gruppen: A+B: Dünndarm, C+D: Kolorektum, E+F: Pankreas; Fascin im Stroma aller Präparate nachweisbar, insgesamt heterogenes Bild mit Anfärbung von Gefäßen und weiteren Zellen im Stroma; Tumoren der WHO-Gruppe 3 zeigen ein diffuses Zellbild mit geringer Abgrenzbarkeit von Tumor und Stroma bei insgesamt verringertem Stroma (B, D, F)

3.2.3.5 CD 34

Von den insgesamt 37 auswertbaren Präparaten war in 32 Präparaten (86,5 %) eine Antikörperpositivität im Stroma detektierbar. Von den 21 auswertbaren Präparaten des *Dünndarms* war in 17 Präparaten (81 %) eine Positivität im Stroma erkennbar, 5 von 6 auswertbaren Präparaten (83,3 %) im *Kolorektum* zeigten eine Positivität. Im *Pankreas* war das Stroma in allen 10 Präparaten (100 %) positiv. Die Tumorzellen zeigten keine Positivität.

Von den insgesamt 27 auswertbaren Präparaten der *WHO-Gruppe 2* war in 24 Präparaten (88,9 %) eine Antikörperpositivität im Stroma detektierbar. Von den 10 auswertbaren Präparaten der *WHO-Gruppe 3* war in 8 Präparaten (80 %) eine Positivität im Stroma erkennbar.

Die CD34-Färbung präsentierte sich insgesamt relativ homogen. Im *Dünndarm* waren in mehr als 80 % der Präparate die Bindegewebssepten zwischen den Tumorzellen mit dem Antikörper gefärbt. Dabei handelte es sich um die Endothelzellen kleinerer Gefäße, die eine Positivität aufwiesen.

Im *Kolorektum* war das Stroma in mehr als 80 % der Präparate für den Antikörper positiv. Es wurden Endothelzellen gefärbt.

Im *Pankreas* präsentierte sich die Färbung sehr homogen. In allen Präparaten waren die Endothelzellen im Tumorstroma deutlich und regelmäßig mit dem Antikörper gefärbt.

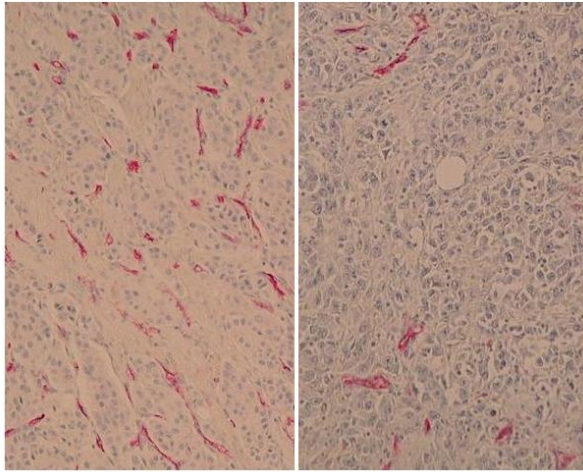
Tumoren der *WHO-Gruppen 2 und 3* zeigten in mehr als 80 % und in 80 % aller Präparate eine Färbung der Endothelzellen im Tumorstroma. Die Dichte der Endothelzellen in den NET der *WHO-Gruppe 3* variierte stärker. Die Endothelzellen in Tumoren der *WHO-Gruppe 3* stellten sich vereinzelt inhomogen konfiguriert dar.

Der Antikörper CD34 färbte insgesamt in mehr als 80% der Präparate die Endothelzellen im Tumorstroma deutlich an. CD34 präsentierte sich als zuverlässiger Marker für die Vaskularisation der NET. Die Tumorzellen waren negativ für den Antikörper. Hämatopoetische Vorläuferzellen konnten nicht mit Sicherheit detektiert werden.

Abb. 38: CD34, repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, 100fache Originalvergrößerung

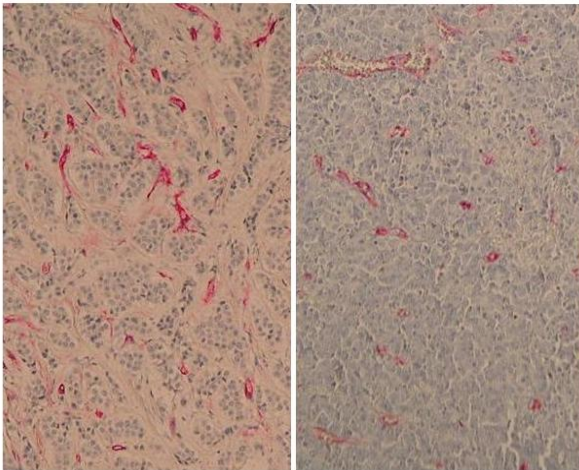
A WHO-Gruppe 2 Dünndarm

B WHO-Gruppe 3 Dünndarm



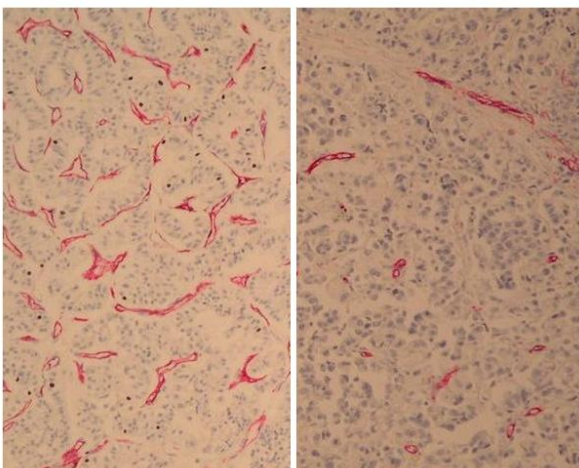
C WHO-Gruppe 2 Kolorektum

D WHO-Gruppe 3 Kolorektum



E WHO-Gruppe 2 Pankreas

F WHO-Gruppe 3 Pankreas



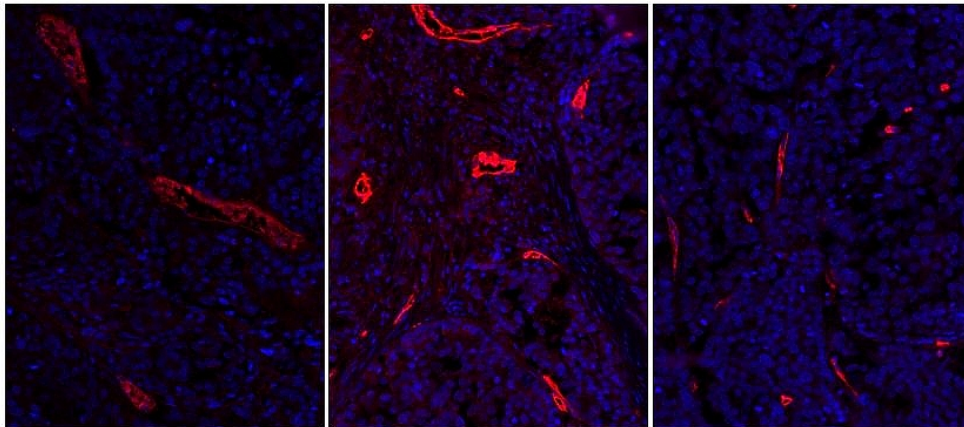
Repräsentative Paraffinschnitte der NET verschiedener Lokalisationen in Hinblick auf die WHO-Gruppen: A+B: Dünndarm, C+D: Kolorektum, E+F: Pankreas; CD34 im Stroma regelmäßig nachweisbar, insgesamt relativ homogenes Bild mit deutlicher Anfärbung der Endothelzellen; CD34 präsentiert sich als verlässlicher Gefäßmarker; Tumorzellen ohne Anfärbung

3.2.3.6 vWF (von-Willebrand-Faktor)

vWF wurde exemplarisch für die Präparate des *Dünndarms* gefärbt. vWF fungierte hier als Stromamarker. Für die NET des *Dünndarms* zeigte sich, dass der Antikörper das von-Willebrand-Antigen in den Endothelzellen anfärbte. Somit kann der vWF als Ergänzung zu CD34 als Gefäßmarker für NET des *Dünndarms* gesehen werden. Die folgenden Abbildungen zeigen verschiedene Ausschnitte eines Präparats des *Dünndarms*, das mit dem vWF-Antikörper in der Immunfluoreszenz gefärbt wurde.

Abb. 39: vWF, repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten in der Immunfluoreszenzfärbung, 200fache Originalvergrößerung

A Dünndarm WHO-Gruppe 3 B Dünndarm WHO-Gruppe 3 C Dünndarm WHO-Gruppe 3



3.3.1 Morphologische Darstellung der Immunzellen

Die Kim1p-positiven Zellen zeigten eine heterogene Morphologie. Während ein großer Teil der Zellen die für fibrohistiozytäre Zellen typischen Ausläufer zeigte, waren einige Zellen größer und stellten sich plump, d.h. ohne Ausläufer dar. Diese plumpen Zellen ließen sich hauptsächlich in den Tumoren der *WHO-Gruppe 3* finden. Die CD3-positiven Zellen zeigten die für Lymphozyten typische runde Konfiguration ohne Präsentation von zellulären Ausläufern. CD68-positive Zellen waren seltener und größer als die anderen untersuchten Immunzellen. Damit zeigten sie z.T. Charakteristika von aktivierten (lysosomenreichen) Gewebsmakrophagen. Die wenigen CD20-positiven Zellen präsentierten sich als kleine, rundliche Zellkomplexe, die teils in follikulären Strukturen angeordnet waren.

Die folgenden Abbildungen stellen Beispiele für die unterschiedlichen Färbungen dar, um die Morphologie der Immunzellen zu veranschaulichen.

Abb. 40: Kim1p, 100fache Originalvergrößerung, Beispiel für die unterschiedliche Morphologie; links: Kim1p-positive Zellen mit den für dendritische Zellen typischen Zellausläufern, rechts: Kim1p-positive Zellen von vorwiegend runder, plumper Gestalt ohne charakteristische Ausläufer

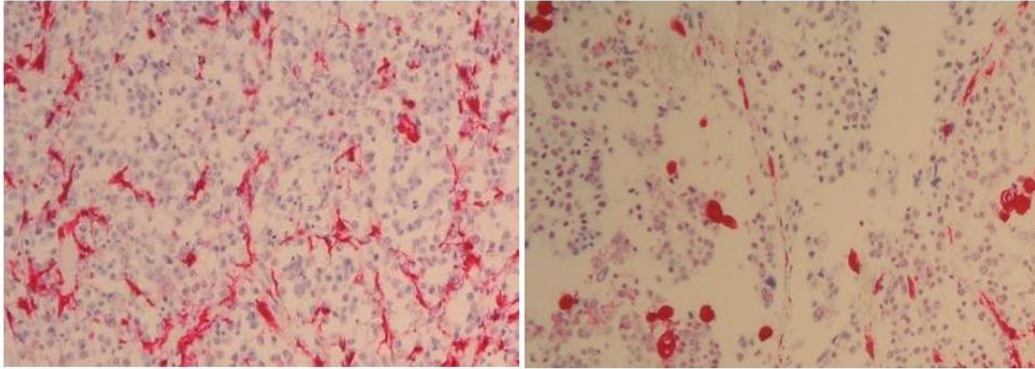


Abb. 41: CD3, 100fache Originalvergrößerung

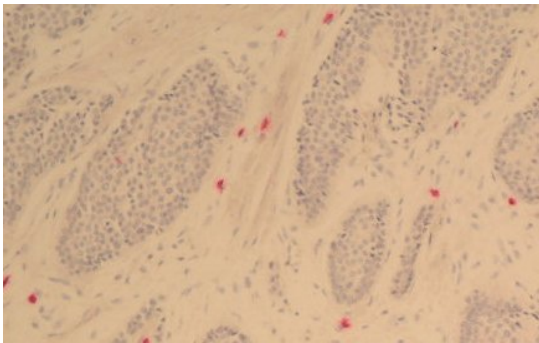


Abb. 42: CD68, 100fache Originalvergrößerung

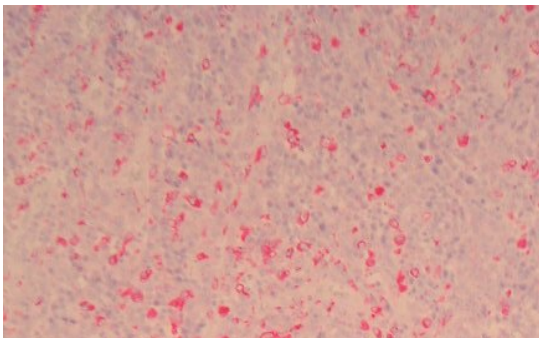
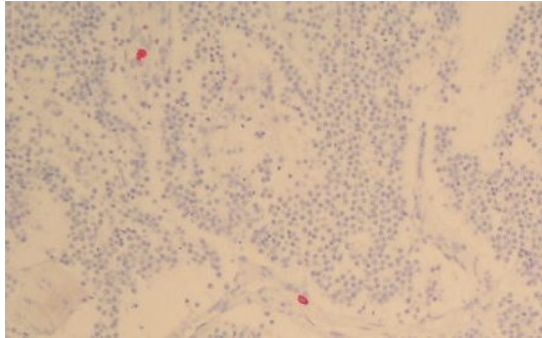


Abb. 43: CD20, 100fache Originalvergrößerung



3.3.2 Quantitative Darstellung der immunhistochemischen Analyse

Kim1p-positive Zellen waren die häufigsten Zellen in den 55 NET. 18,2 % (± 11 %) der Zellen stellten sich Kim1p-positiv dar; 4,8 % ($\pm 5,2$ %) der Zellen waren positiv für CD3; 1,6 % ($\pm 2,9$ %) der Zellen waren CD68-positiv. Die prozentuale Anzahl von CD20-positiven Zellen war gering. Es stellten sich durchschnittlich 0,7 % ($\pm 1,9$ %) der Zellen CD20-positiv dar.

In den 32 NET des *Dünndarms* stellten sich 16,9 % ($\pm 10,1$ %) der Zellen Kim1p-positiv dar; 4,5 % (± 6 %) der Zellen waren CD3-positiv; 0,8 % ($\pm 1,6$ %) zeigten eine CD68-Positivität und 0,5 % ($\pm 0,9$ %) waren positiv für CD20.

In den 13 NET des *Kolorektums* stellten sich 21,2 % (± 14 %) der Zellen Kim1p-positiv dar; 6,8 % ($\pm 4,6$ %) der Zellen waren CD3-positiv; 3,9 % ($\pm 4,7$ %) zeigten eine CD68-Positivität und 1,5 % ($\pm 3,7$ %) waren positiv für CD20.

In den 10 NET des *Pankreas* stellten sich 18,5 % ($\pm 9,4$ %) der Zellen Kim1p-positiv dar; 3,1 % (± 2 %) der Zellen waren CD3-positiv; 1,1 % ($\pm 1,2$ %) zeigten eine CD68-Positivität und 0,3 % ($\pm 0,3$ %) waren positiv für CD20.

Die NET des *Kolorektums* zeigten im Vergleich zu den NET des *Dünndarms* und den NET des *Pankreas* bei allen vier Antikörpern zur Detektion von Immunzellen eine höhere prozentuale Häufigkeit, die für die CD68-positiven Zellen signifikant war ($p < 0,01$).

Die unterschiedliche prozentuale Häufigkeit der Immunzellen abhängig von der Lokalisation ist in Abbildung 44 graphisch dargestellt.

In den verschiedenen WHO-Gruppen der NET zeigten sich Unterschiede in der Verteilung.

Bei den NET der *WHO-Gruppe 1* stellten sich 7,6 % ($\pm 3,7$ %) der Zellen Kim1p-positiv dar; 4,2 % ($\pm 3,3$ %) der Zellen waren CD3-positiv; 0,1 % ($\pm 0,1$ %) zeigten eine CD68-Positivität und 0,3 % ($\pm 0,8$ %) waren positiv für CD20.

Bei den NET der *WHO-Gruppe 2* stellten sich 19,9 % ($\pm 8,7$ %) der Zellen Kim1p-positiv dar; 3,4 % ($\pm 2,7$ %) der Zellen waren CD3-positiv; 0,8 % ($\pm 1,8$ %) zeigten eine CD68-Positivität und 0,9 % ($\pm 2,6$ %) waren positiv für CD20.

In den NET der *WHO-Gruppe 3* war mit Ausnahme der CD20-positiven Zellen, die insgesamt eine eher untergeordnete Rolle spielten, bei den anderen drei Antikörpern zur Detektion von Immunzellen eine höhere prozentuale Anzahl an Zellen nachweisbar.

Bei den NET der *WHO-Gruppe 3* stellten sich 28,1 % ($\pm 11,6$ %) der Zellen positiv für Kim1p dar; 9,6 % ($\pm 9,1$ %) der Zellen waren CD3-positiv; 5,8 % ($\pm 3,4$ %) zeigten eine CD68-Positivität und 0,7 % ($\pm 0,6$ %) waren positiv für CD20.

Die Anzahl Kim1p-positiver Zellen und CD-68-positiver Zellen nahm mit steigender WHO-Gruppe tendenziell zu. In NET der *WHO-Gruppe 3* war die prozentuale Anzahl an Kim1p-positiven Zellen signifikant höher als in NET der *WHO-Gruppe 1* ($p < 0,01$). In NET der *WHO-Gruppe 2* war die prozentuale Anzahl Kim1p-positiver Zellen signifikant höher als in NET der *WHO-Gruppe 1* ($p < 0,01$). In NET der *WHO-Gruppe 3* war die prozentuale Anzahl CD68-positiver Zellen signifikant höher als in NET der *WHO-Gruppen 1 und 2* ($p < 0,01$).

Die prozentuale Anzahl CD3-positiver Zellen war in NET der *WHO-Gruppe 3* signifikant höher als in NET der *WHO-Gruppe 2* ($p < 0,01$).

Die unterschiedliche prozentuale Häufigkeit der Immunzellen abhängig von der WHO-Gruppe, entsprechend der WHO-Klassifikation von 2000 ist in Abbildung 45 graphisch dargestellt.

Unter Berücksichtigung des Gradings der WHO-Klassifikation von 2000, die der Einteilung in die drei prognostischen Gruppen *Neuroendokrine Neoplasie Grad 1 (NEN-G1)*, *Neuroendokrine Neoplasie Grad 2 (NEN-G2)* und *Neuroendokrines Karzinom Grad 3 (NEC-G3)* nach der WHO-Klassifikation von 2010 entspricht (Klimstra et al. 2010), zeigte sich tendenziell eine erhöhte Anzahl an Immunzellen mit steigendem Grading, wobei der Unterschied zwischen G1-Tumoren und G3-Tumoren für CD68 signifikant war ($p < 0,01$). Unter Annahme eines Signifikanzniveaus von 0,05 wären die Unterschiede zwischen *G1-Tumoren* und *G3-Tumoren* für Kim1p bzw. zwischen *G2-Tumoren* und *G3-Tumoren* für CD68 ebenfalls signifikant gewesen.

In den 39 *NEN-G1* stellten sich 15,4 % ($\pm 9,8$ %) der Zellen Kim1p-positiv dar; 3,8 % (± 3 %) der Zellen waren CD3-positiv; 0,5 % ($\pm 1,5$ %) zeigten eine CD68-Positivität und 0,6 % ($\pm 2,2$ %) waren positiv für CD20.

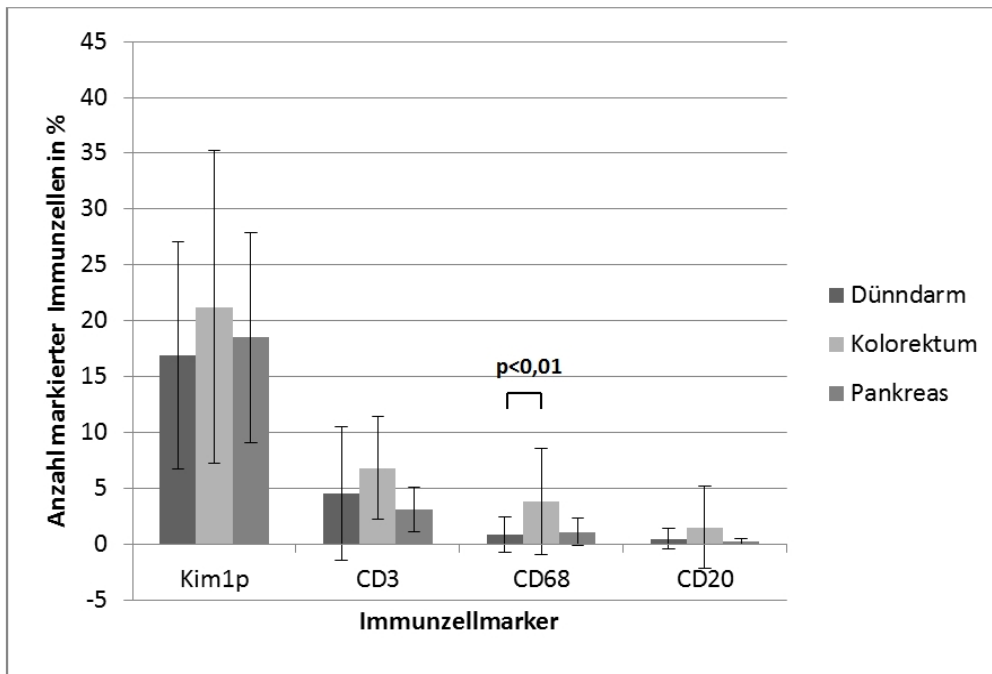
In den 8 *NEN-G2* stellten sich 21,7 % ($\pm 9,2$ %) der Zellen Kim1p-positiv dar; 4,2 % ($\pm 3,5$ %) der Zellen waren CD3-positiv; 1,9 % ($\pm 2,7$ %) zeigten eine CD68-Positivität und 1,2 % ($\pm 1,5$ %) waren positiv für CD20.

In den 8 *NEC-G3* stellten sich 28,3 % ($\pm 12,5$ %) der Zellen Kim1p-positiv dar; 10,4 % ($\pm 10,4$ %) der Zellen waren CD3-positiv; 6,4 % ($\pm 3,3$ %) zeigten eine CD68-Positivität und 0,6 % ($\pm 0,5$ %) waren positiv für CD20.

Die unterschiedliche prozentuale Häufigkeit der Immunzellen abhängig vom Grading, entsprechend der WHO-Klassifikation von 2010, ist in Abbildung 46 graphisch dargestellt.

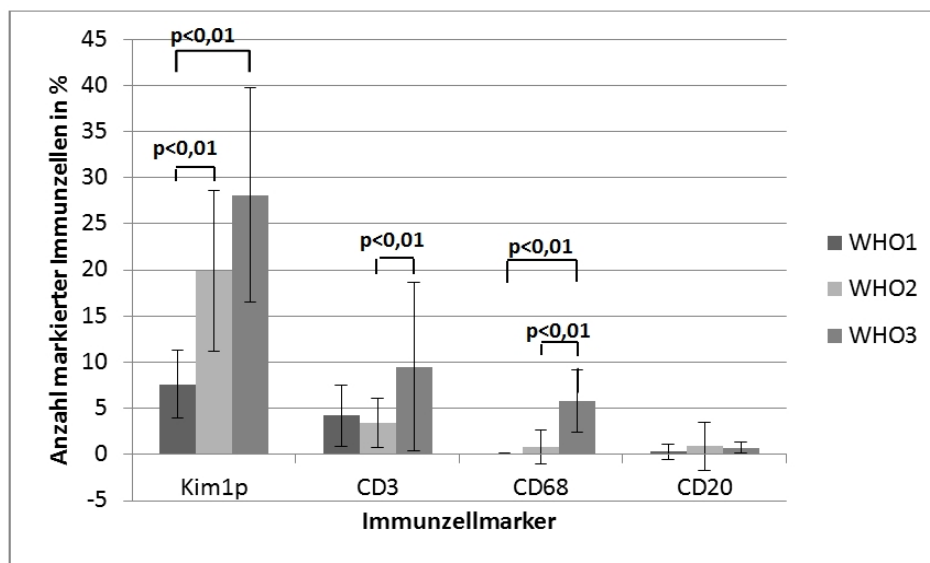
Darüber hinaus war die prozentuale Anzahl der Immunzellen von der Größe des Tumors abhängig. Mit zunehmender Tumorgöße stieg die Anzahl Kim1p-positiver Zellen und CD68-positiver Zellen signifikant an ($p < 0,01$).

Abb. 44: Die Abbildung fasst die Unterschiede in der prozentualen Anzahl der Immunzellen bezüglich der Organlokalisation zusammen.



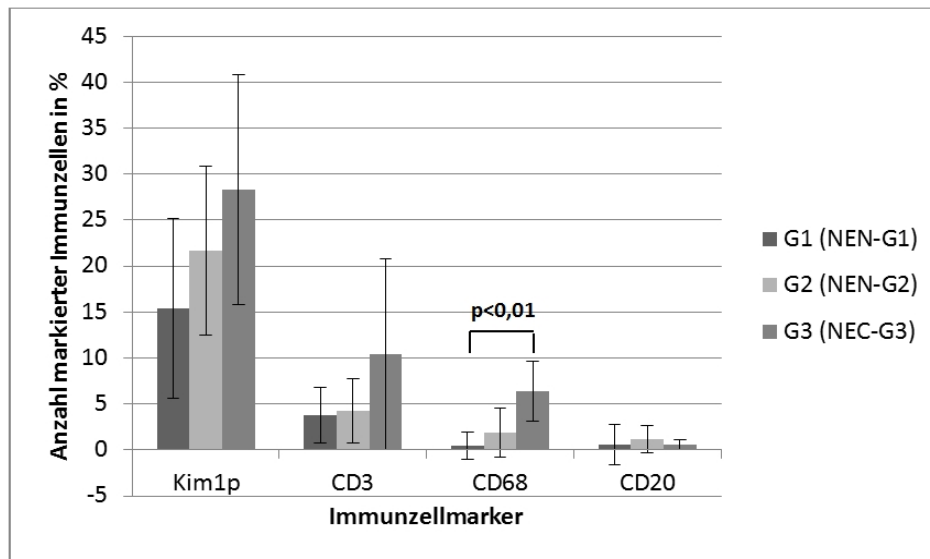
Die prozentuale Anzahl an Kim1p-positiven Zellen war signifikant höher als die durchschnittliche Anzahl aller anderen gefärbten Immunzellen ($p < 0,01$). Die Anzahl an CD68-positiven Zellen war im *Kolorektum* am höchsten im Vergleich zu den anderen beiden Organlokalisationen. Der Unterschied zwischen *Kolorektum* und *Dünndarm* war für CD68 signifikant ($p < 0,01$). CD20-positive Zellen waren vernachlässigbar. Insgesamt unterschied sich die prozentuale Anzahl der Immunzellen in den Organen nur geringfügig mit der Tendenz eines erhöhten Vorkommens von Immunzellen im *Kolorektum*.

Abb. 45: Die Abbildung fasst die Unterschiede in der prozentualen Anzahl der Immunzellen bezüglich der WHO-Gruppe zusammen, entsprechend der WHO-Klassifikation von 2000.



Die prozentuale Anzahl Kim1p-positiver Zellen und CD68-positiver Zellen stieg mit zunehmender WHO-Gruppe tendenziell an. Die Unterschiede zwischen NET der *WHO-Gruppe 1* und NET der *WHO-Gruppe 2* bzw. die Unterschiede zwischen NET der *WHO-Gruppe 1* und NET der *WHO-Gruppe 3* waren für Kim1p signifikant ($p < 0,01$). In NET der *WHO-Gruppe 3* war die prozentuale Anzahl CD68-positiver Zellen im Vergleich zu NET der *WHO-Gruppe 1* und *2* signifikant erhöht ($p < 0,01$). In NET der *WHO-Gruppe 3* zeigte sich eine signifikant höhere prozentuale Anzahl an CD3-positiven Zellen als in NET der *WHO-Gruppe 2* ($p < 0,01$).

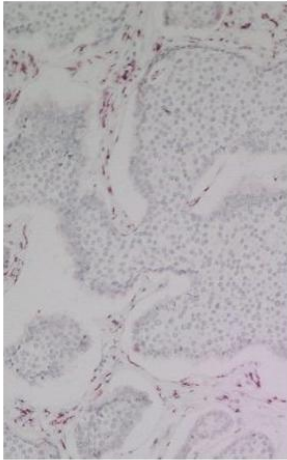
Abb. 46: Die Abbildung fasst die Unterschiede in der prozentualen Anzahl der Immunzellen bezüglich des Gradings nach den Konsensus-Konferenzen von Frascati zusammen (Rindi et al. 2006b, 2007, Klöppel et al. 2007), entsprechend der WHO-Klassifikation von 2010 (Klimstra et al. 2010)



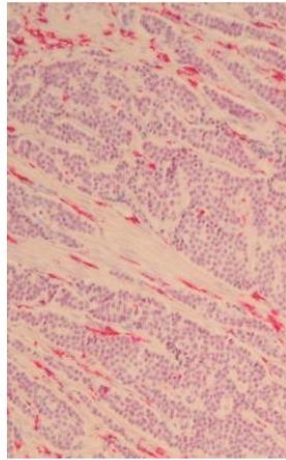
Die prozentuale Anzahl der Immunzellen stieg mit zunehmendem Grading für Kim1p, CD3 und CD68 tendenziell an, wobei der Unterschied zwischen *G1-Tumoren* und *G3-Tumoren* für CD68 signifikant war ($p < 0,01$). Unter Annahme eines Signifikanzniveaus von 0,05 wären die Unterschiede zwischen *G1-Tumoren* und *G3-Tumoren* für Kim1p bzw. zwischen *G2-Tumoren* und *G3-Tumoren* für CD68 ebenfalls signifikant gewesen.

Abb. 47: Repräsentative Kim1p-Schnitte, 100fache Vergrößerung

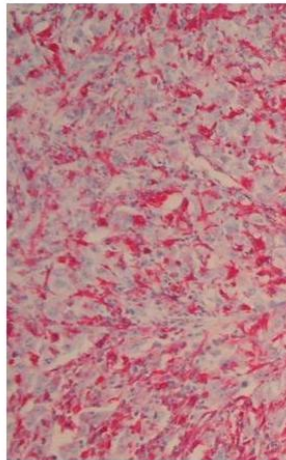
A WHO-Gruppe 1 Dünndarm



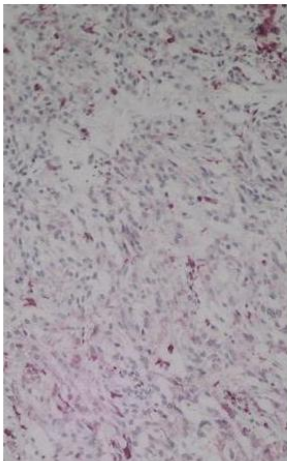
B WHO-Gruppe 2 Dünndarm



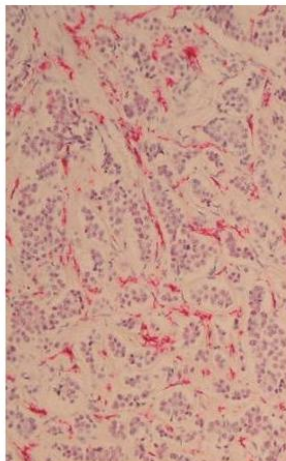
C WHO-Gruppe 3 Dünndarm



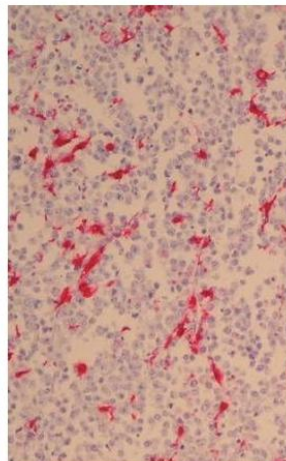
D WHO-Gruppe 1 Kolorektum



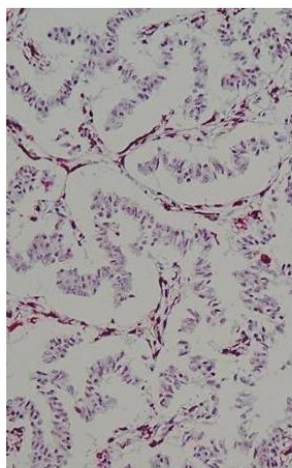
E WHO-Gruppe 2 Kolorektum



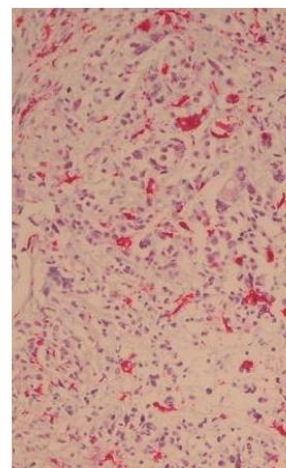
F WHO-Gruppe 3 Kolorektum



G WHO-Gruppe 2 Pankreas



H WHO-Gruppe 3 Pankreas



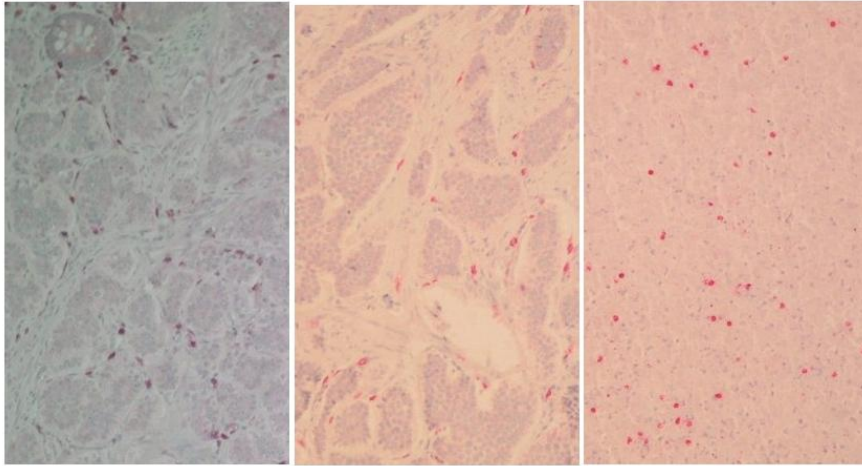
Repräsentative Paraffinschnitte der NET verschiedener Lokalisationen in Hinblick auf die WHO-Gruppen: A-C: Dünndarm, D-F: Kolorektum, G+H: Pankreas; bezeichnend ist die Zunahme der Kim1p-positiven Zellen mit der WHO-Gruppe; Immunzellen in Tumoren der WHO-Gruppe 3 treten in Kontakt mit Tumorzellen bei deutlich aufgelockertem Tumorstroma (C, F, H)

Abbildung 48: Repräsentative CD3-Schnitte, 100fache Vergrößerung

A WHO-Gruppe 1 Dünndarm

B WHO-Gruppe 2 Dünndarm

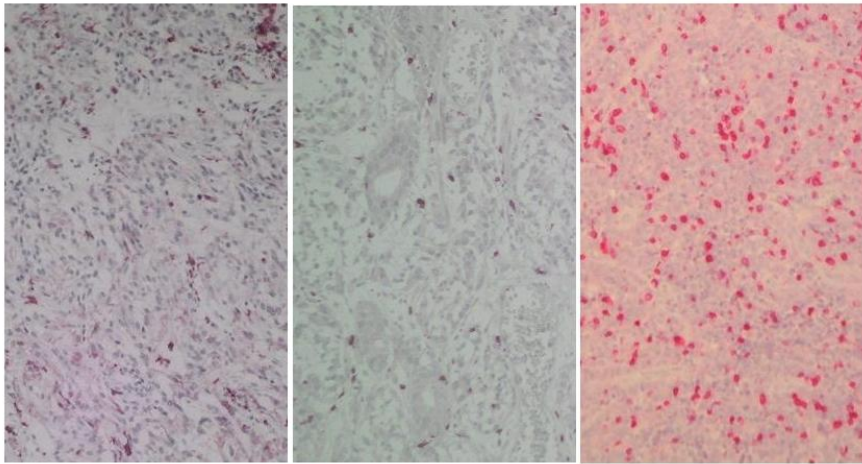
C WHO-Gruppe 3 Dünndarm



D WHO-Gruppe 1 Kolorektum

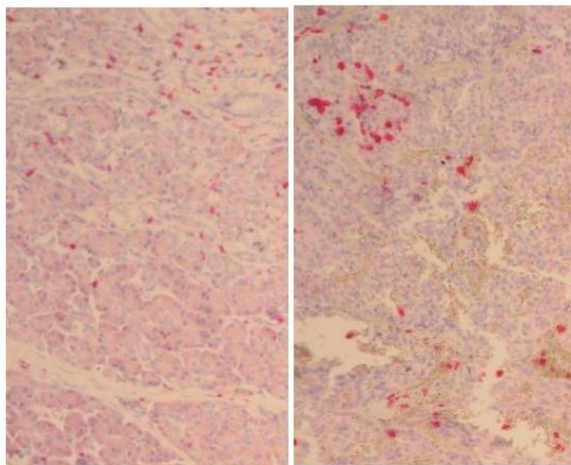
E WHO-Gruppe 2 Kolorektum

F WHO-Gruppe 3 Kolorektum



G WHO-Gruppe 2 Pankreas

H WHO-Gruppe 3 Pankreas



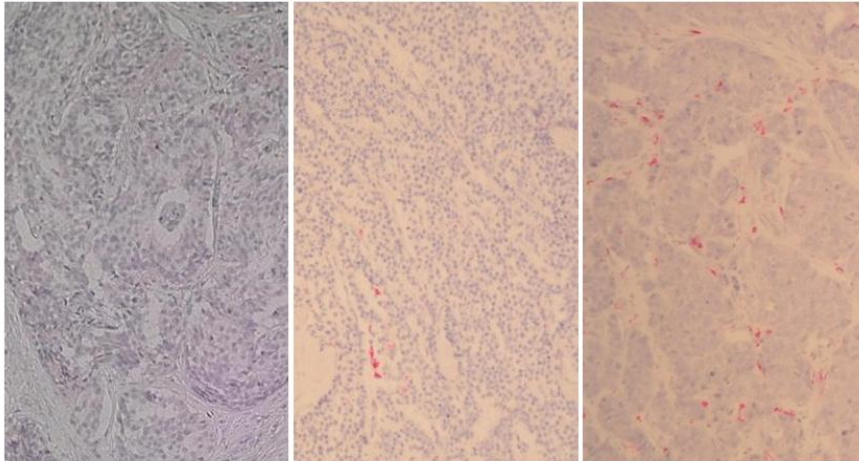
Repräsentative Paraffinschnitte der NET verschiedener Lokalisationen in Hinblick auf die WHO-Gruppen: A-C: Dünndarm, D-F: Kolorektum, G+H: Pankreas; in Tumoren der WHO-Gruppe 3 befinden sich mehr CD3-positive Zellen im Vergleich zu Tumoren der WHO-Gruppen 1 bzw. 2 (C, F, H); Immunzellen in Tumoren der WHO-Gruppe 3 treten in Kontakt mit Tumorzellen bei deutlich aufgelockertem Tumorstroma (C, F, H)

Abbildung 49: Repräsentative CD68-Schnitte, 100fache Vergrößerung

A WHO-Gruppe 1 Dünndarm

B WHO-Gruppe 2 Dünndarm

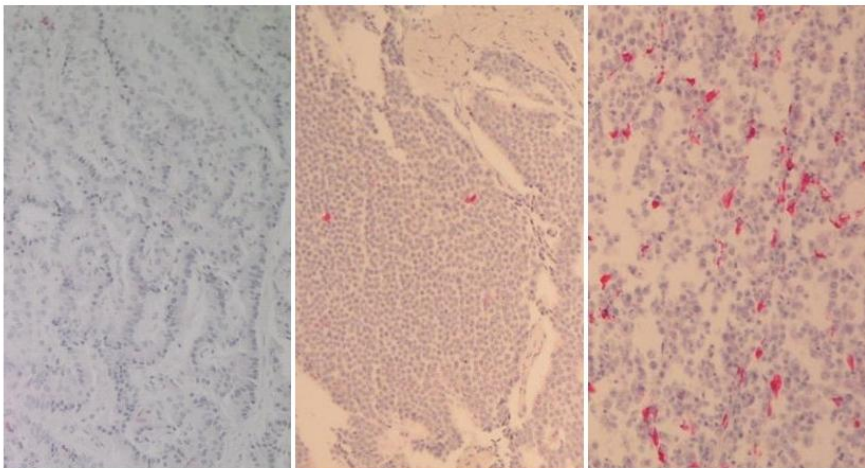
C WHO-Gruppe 3 Dünndarm



D WHO-Gruppe 1 Kolorektum

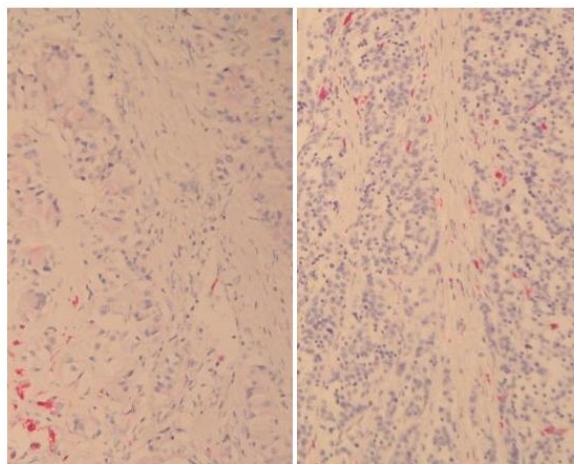
E WHO-Gruppe 2 Kolorektum

F WHO-Gruppe 3 Kolorektum



G WHO-Gruppe 2 Pankreas

H WHO-Gruppe 3 Pankreas



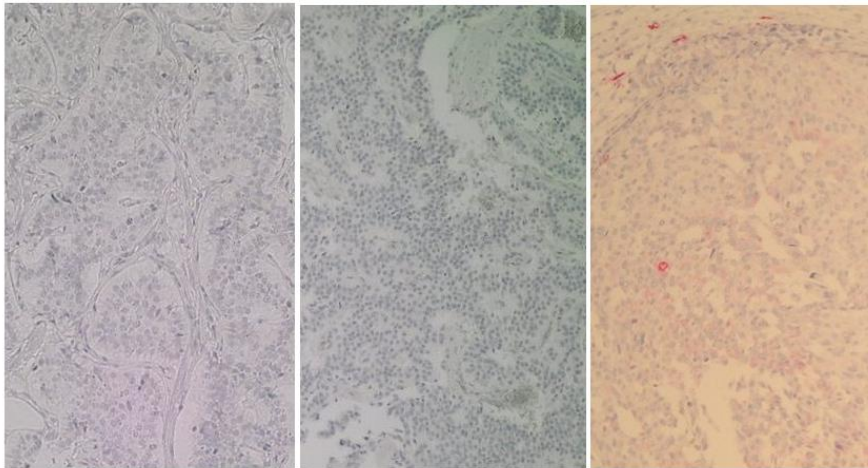
Repräsentative Paraffinschnitte der NET verschiedener Lokalisationen in Hinblick auf die WHO-Gruppen: A-C: Dünndarm, D-F: Kolorektum, G+H: Pankreas; insgesamt wenig positive Zellen, vermehrt CD68-positive Zellen in Tumoren der WHO-Gruppe 3

Abb. 50: Repräsentative CD20 Schnitte, 100fache Vergrößerung

A WHO-Gruppe 1 Dünndarm

B WHO-Gruppe 2 Dünndarm

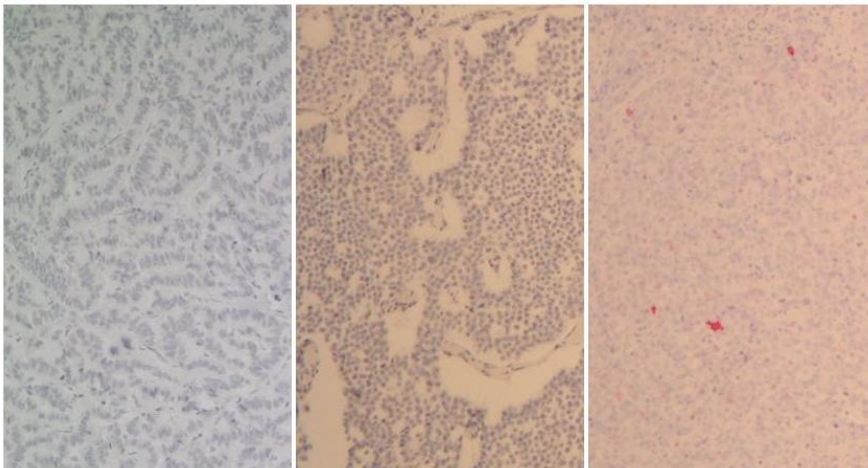
C WHO-Gruppe 3 Dünndarm



D WHO-Gruppe 1 Kolorektum

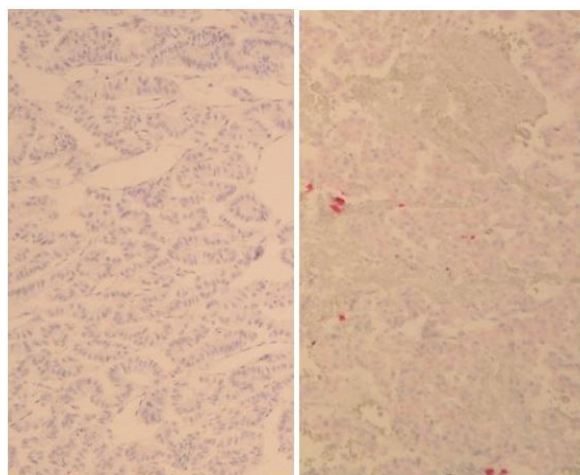
E WHO-Gruppe 2 Kolorektum

F WHO-Gruppe 3 Kolorektum



G WHO-Gruppe 2 Pankreas

H WHO-Gruppe 3 Pankreas



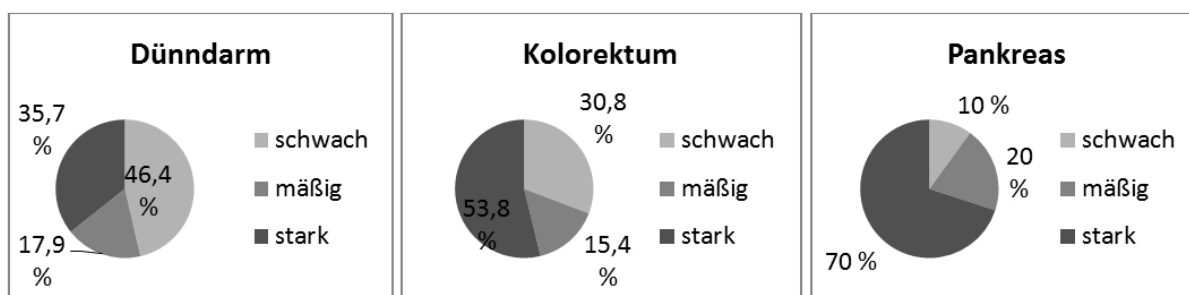
Repräsentative Paraffinschnitte der NET verschiedener Lokalisationen in Hinblick auf die WHO-Gruppen: A-C: Dünndarm, D-F: Kolorektum, G+H: Pankreas; insgesamt kaum positive Zellen erkennbar; CD20-positive Zellen spielen eine vernachlässigbare Rolle.

3.4 Darstellung des CCR2

Von den insgesamt 51 auswertbaren Präparaten waren alle Präparate (100 %) positiv, 18 Präparate (35,3 %) zeigten eine schwache, 9 Präparate (17,6 %) eine mäßige und 24 Präparate (47,1 %) eine starke Positivität. Das Zytoplasma der einzelnen Tumorzellen färbte sich dabei homogen an. Bei den Tumoren mit trabekulärem Wachstumsmuster war vereinzelt eine stärkere Färbung des Zellpols, der an das Stroma grenzte, zu erkennen. Der durchschnittliche „Score“ betrug 36,5 (± 36).

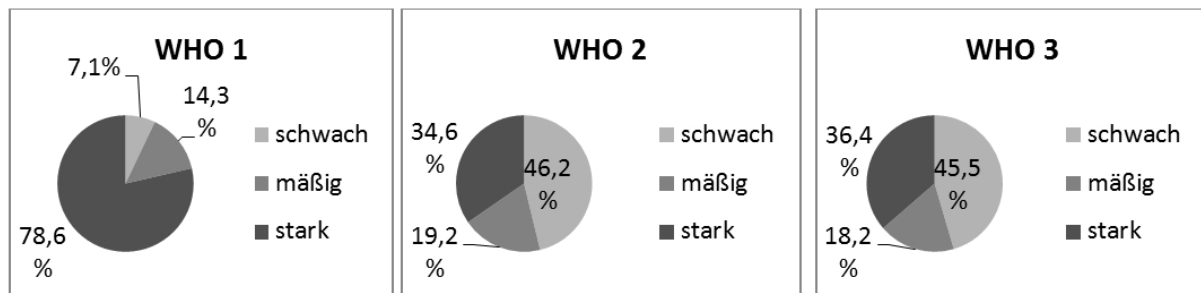
Von den 28 auswertbaren Präparaten des *Dünndarms* zeigten 13 Präparate (46,4 %) eine schwache, 5 Präparate (17,9 %) eine mäßige und 10 Präparate (35,7 %) eine starke Positivität. Der durchschnittliche „Score“ betrug 23,3 ($\pm 19,1$). Von den 13 auswertbaren Präparaten des *Kolorektums* zeigten 4 Präparate (30,8 %) eine schwache, 2 Präparate (15,4 %) eine mäßige und 7 Präparate (53,8 %) eine starke Positivität. Der durchschnittliche „Score“ betrug 50,3 ($\pm 2,7$). Von den 10 auswertbaren Präparaten des *Pankreas* zeigte 1 Präparat (10 %) eine schwache, 2 Präparate (20 %) eine mäßige und 7 Präparate (70 %) eine starke Positivität. Der durchschnittliche „Score“ betrug 55,7 ($\pm 49,4$).

Abb. 51: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der Organlokalisierung für CCR2



Von den 14 auswertbaren Präparaten der *WHO-Gruppe 1* zeigte 1 Präparat (7,1 %) eine schwache, 2 Präparate (14,3 %) eine mäßige und 11 Präparate (78,6 %) eine starke Positivität. Der durchschnittliche „Score“ betrug 59,9 ($\pm 34,3$). Von den 26 auswertbaren Präparaten der *WHO-Gruppe 2* zeigten 12 Präparate eine schwache (46,2 %), 5 Präparate (19,2 %) eine mäßige und 9 Präparate (34,6 %) eine starke Positivität. Der durchschnittliche „Score“ betrug 25,4 ($\pm 27,8$). Von den 11 auswertbaren Präparaten der *WHO-Gruppe 3* zeigten 5 Präparate (45,5 %) eine schwache, 2 Präparate (18,2 %) eine mäßige und 4 Präparate (36,4 %) eine starke Positivität. Der durchschnittliche „Score“ betrug 33,2 ($\pm 43,8$).

Abb. 52: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der WHO-Gruppe für CCR2

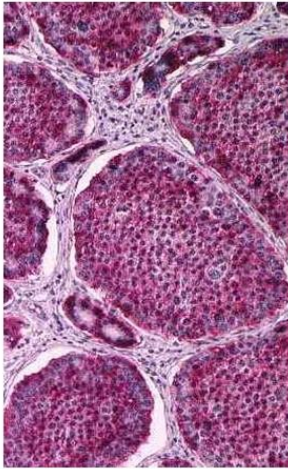


Die NET des *Kolorektums* zeigten eine signifikant stärkere Positivität als die NET des *Dünndarms* ($p < 0,01$). Der Unterschied der „Scores“ betrug 27. Die NET des *Pankreas* zeigten eine signifikant stärkere Positivität als die NET des *Dünndarms* ($p < 0,01$). Der Unterschied betrug 32,4.

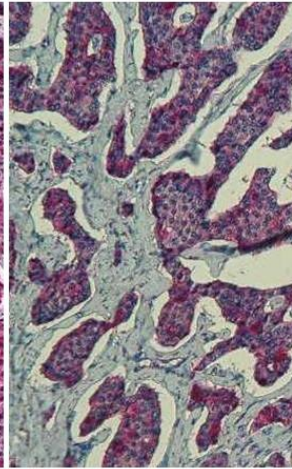
Die NET der *WHO-Gruppe 1* zeigten eine stärkere Positivität als NET der *WHO-Gruppen 2 und 3*. Der Unterschied zwischen NET der *WHO-Gruppe 1* und NET der *WHO-Gruppe 2* war signifikant ($p < 0,01$).

Abb. 53: CCR2, repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, 100fache Originalvergrößerung

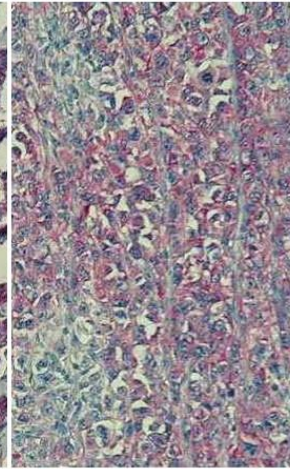
A WHO-Gruppe 1 Dünndarm



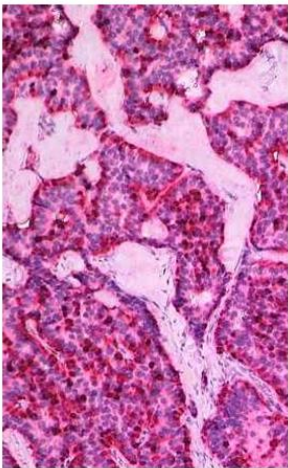
B WHO-Gruppe 2 Dünndarm



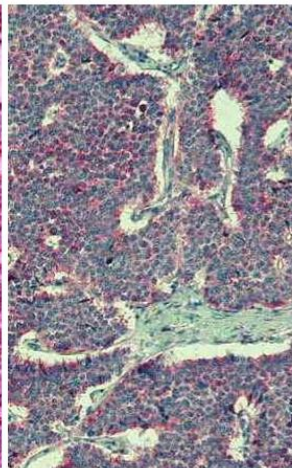
C WHO-Gruppe 3 Dünndarm



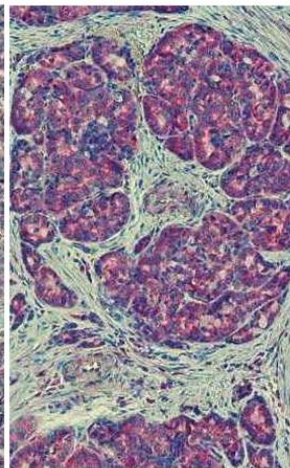
D WHO-Gruppe 1 Kolorektum



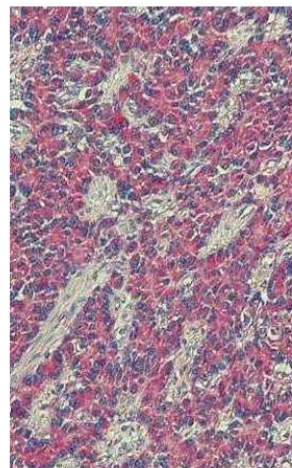
E WHO-Gruppe 2 Kolorektum



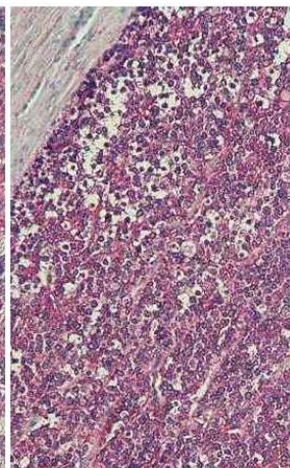
F WHO-Gruppe 3 Kolorektum



G WHO-Gruppe 2 Pankreas



H WHO-Gruppe 3 Pankreas



Repräsentative Paraffinschnitte der NET verschiedener Lokalisationen in Hinblick auf die WHO-Gruppen: A-C: Dünndarm, D-F: Kolorektum, G+H: Pankreas; Tumorzellen deutlich gefärbt; Tumoren der WHO-Gruppe 1 mit höherer Intensität der Färbung (A+D)

4 Diskussion

4.1 Fragestellung

Dies ist die erste Untersuchung des Mikroenvironments neuroendokriner Tumoren vom epithelialen Typ. NET stellen eine seltene Tumorgruppe mit einer zunehmenden Inzidenz zwischen 2,0/100.000 und 6,5/100.000 Einwohnern dar (Hauso et al. 2008, Hemminki und Li 2001). NET vom epithelialen Typ zeigen eine heterogene Histologie (Iacobuzio-Donahue et al. 2005) und eine heterogene Tumorbilogie (Auerswald 2008).

Dieser Untersuchung liegt die WHO-Klassifikation von 2000 zugrunde (Klöpffel et al. 2007). Eine neue WHO-Klassifikation von 2010 verlässt die aufwendige Hybridklassifikation von 2000, die die Größe und Metastasierung beinhaltet. Die neue Klassifikation benutzt erstmals den Begriff der neuroendokrinen Neoplasie, um die potentielle Malignität aller NET zu betonen, wobei das Grading auf dem Ki-67-Index basiert (Klimstra et al. 2010).

Meine Ergebnisse zeigen, dass dendritische Zellen, Makrophagen und T-Lymphozyten im Tumorstroma neuroendokriner Tumoren vorkommen. Die Verteilung von Makrophagen und dendritischen Zellen in NET des gastroenteropankreatischen Systems wurde bisher nicht untersucht. Es existiert eine Studie, die eine vereinzelte Ansammlung von Lymphozyten in NET zeigt (Vikman et al. 2009). In NET des *Kolorektums* kommen tendenziell mehr Immunzellen vor. Die NET der *WHO-Gruppe 3* zeigen eine höhere prozentuale Häufigkeit von dendritischen Zellen, Makrophagen und T-Lymphozyten. Die Immunzellen sind in ein unterschiedliches Tumorstroma aus Myofibroblasten, Gefäßen und Bindegewebssträngen eingebettet. NET der *WHO-Gruppe 3* zeigen ein aufgelockertes, schmales Stroma. NET der *WHO-Gruppen 1 bzw. 2* weisen ein breites Stroma mit ausgeprägtem Bindegewebe zwischen den Tumorzellnestern auf. Die Immunzellen befinden sich im Stroma zwischen den Tumorzellnestern.

Im Folgenden diskutiere ich die in der Einleitung gestellten Fragen. Dabei soll zunächst auf die Verteilung der NET in dem mir vorliegenden Kollektiv in Hinblick auf die Organlokalisierung, WHO-Klassifikation, das Grading, die Größe, das Geschlecht und Alter eingegangen werden. Danach betrachte ich die histologische Struktur der Tumoren und des Tumorstromas (Tumormarker, histologische Wachstumsmuster, Tumorstromamarker). Anschließend werde ich die Verteilung der Immunzellen und die Interaktion zwischen Tumor und Tumorstroma durch Chemokinrezeptoren diskutieren. Ich werde dabei die Unterschiede der Tumoren im Hinblick auf die Tumormarker, die Ausprägung des Tumorstromas und die Verteilung der Immunzellen in Abhängigkeit der Organlokalisierung und der WHO-Gruppierung herausstellen.

4.2 Charakterisierung des Tumorkollektivs (Organlokalisierung, WHO-Klassifikation, Grading, Tumorgröße, Geschlechts- und Altersverteilung)

4.2.1 Organlokalisierung

In meiner Arbeit habe ich insgesamt 55 neuroendokrine Tumoren vom epithelialen Typ untersucht. Von den 55 Tumoren stammten 32 aus dem *Dünndarm* (58,2 %), 13 aus dem *Kolorektum* (23,6 %) und 10 aus dem *Pankreas* (18,2 %). Trotz der geringen Anzahl an Tumoren und unter Bezug auf lediglich drei Organsysteme entspricht die Verteilung im Wesentlichen den Ergebnissen der Literatur. In mehreren Studien über die Epidemiologie der NET stellten die Tumoren des Dünndarms die häufigsten NET dar (Hauso et al. 2008, Hemminki und Li 2001, Auerswald 2008), wobei in der amerikanischen Population mittlerweile bronchopulmonale NET häufiger vertreten sind (Hauso et al. 2008). NET des Dünndarms werden z.B. durch einen Subileus klinisch eher symptomatisch.

4.2.2 WHO-Klassifikation und Grading

Von den 55 NET aus meinem Kollektiv gehörten nach der WHO-Klassifikation von 2000 27,3 % zur *WHO-Gruppe 1*, 52,7 % zur *WHO-Gruppe 2* und 20 % zur *WHO-Gruppe 3*; 70,9 % waren *G1-Tumoren*, jeweils 14,5 % waren *G2-*, bzw. *G3-Tumoren*. Die Verteilung deckt sich mit den Angaben in der Literatur. In einer Analyse über die Epidemiologie, Diagnostik und Therapie neuroendokriner Tumoren aus dem Zeitraum zwischen 1988 und 2005 waren von den untersuchten NET (n=64) 59,38 % *G1-*, 3,13 % *G2-*, und 14,06 % *G3-Tumoren*. Bei 23,44 % der Tumoren wurde kein Grading vorgenommen (Auerswald 2008).

Auffallend ist die Diskrepanz zwischen hoher Anzahl *WHO-Gruppe 2-Tumoren* und niedriger Anzahl an *G2-Tumoren* in meinem Kollektiv. Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass die *G1-Tumoren* der *WHO-Gruppe 2* zwar einen niedrigen Proliferationsindex aufwiesen, allerdings größer als 2 cm im maximalen Tumordurchmesser waren bzw. bereits nodale Metastasen oder eine Invasion der Muscularis propria und Angioinvasion zeigten, so dass sie nach der WHO-Klassifikation von 2000 zu den gut differenzierten neuroendokrinen Karzinomen gezählt wurden (Klöppel et al. 2007). Es ist sinnvoll, größere NET, die Angioinvasion, eine Invasion der Muscularis propria und eine nodale Metastasierung zeigen, aufgrund des eindeutig malignen Verhaltens trotz niedrigen Proliferationsindex zu den Tumoren der *WHO-Gruppe 2* nach der Klassifikation von 2000 zu zählen. Die WHO-Klassifikation von 2010 unterscheidet die drei prognostischen Gruppen nur noch in Abhängigkeit des Gradings (Klimstra et al. 2010), wobei das biologische Verhalten insofern bei der Einteilung keine Rolle mehr spielt, als dass alle NET als potentiell maligne betrachtet werden (Klimstra et al. 2010). Diese Einschätzung entspricht den Erkenntnissen aus der

Literatur. Es ist bekannt, dass NET mit geringer Proliferation eine nodale Metastasierung hervorrufen können. In einer immunhistochemischen Studie über Karzinoide des *Jejunums* und *Ileums* zeigten 29 % der jejunoilealen Karzinoide trotz einer Mitoserate von 0/50 HPF eine Lymphknotenmetastasierung (Burke et al. 1997). Möglicherweise spielt die Größe die wichtigere Rolle für die Metastasierungswahrscheinlichkeit. In der Literatur ist bekannt, dass NET des *Dünndarms* mit einem Durchmesser ≤ 1 cm bis zu 25 % Metastasen aufweisen können, wohingegen NET des *Dünndarms* mit einem Durchmesser ≥ 2 cm bis zu 95 % Metastasen zeigen (Rorstad 2005). Eine Studie über klinisch-pathologische Proliferationsmarker in gastrointestinalen Karzinoiden zeigt eine Korrelation zwischen Ki-67-Proliferationsindex und Größe der Tumoren (Sökmensüer et al. 2001). Obwohl Ki-67 als valider prognostischer Marker für gastrointestinale Karzinoide etabliert ist (Rorstad 2005), muss man sich fragen, warum kleine NET mit niedrigem Ki-67-Proliferationsindex dennoch metastasieren. Möglicherweise spielen hier das Tumormikroenvironment bzw. die Immunzellen eine Rolle.

4.2.3 Tumorgröße

NET des *Pankreas* waren mit 4,5 cm durchschnittlicher maximaler Tumorgröße zum Zeitpunkt der Operation signifikant größer als NET des *Dünndarms*, die eine durchschnittliche maximale Tumorausdehnung von 2,5 cm aufwiesen ($p < 0,01$). Eine immunhistochemische Studie über die Karzinoide des *Ileums* und *Jejunums* kam zu ähnlichen Ergebnissen. Während die Karzinoide des *Ileums* ($n=118$) durchschnittlich 2,5 cm (± 3 cm) groß waren, waren die Karzinoide des *Jejunums* ($n=18$) mit 1,5 cm ($\pm 0,7$ cm) etwas kleiner (Burke et al. 1997). In einer molekularen Analyse von gastroenteropankreatischen Tumoren ($n=24$) lag die durchschnittliche Tumorgröße pankreatischer NET bei 4,6 cm (Duerr et al. 2008). Die Ergebnisse decken sich mit meinen Resultaten. Möglicherweise fallen nicht-hormonaktive NET des *Pankreas* erst ab einer gewissen Größe durch eine lokale klinische Symptomatik oder durch eine chronische Pankreasinsuffizienz auf.

4.2.4 Geschlechts- und Altersverteilung

Das Geschlechterverhältnis von Frauen zu Männern lag in meinen Ergebnissen bei 1,04:1,0. Frauen sind etwas häufiger von NET betroffen. In einer schwedischen Analyse über die Inzidenz und Risikofaktoren von Karzinoiden, deren Daten aus dem schwedischen Krebs-Familienregister von 1958-1998 stammen ($n=5184$), war das Geschlechterverhältnis von

Frauen zu Männern bei 1,17:1,0; entsprechend war die Inzidenz bei Frauen mit 2.4/100.000 im Vergleich zu Männern (2.0/100.000) höher (Hemminki und Li 2001), wobei die Inzidenzrate für die häufige Lokalisation der NET im Bereich des Dünndarms bei Männern größer ist (Hauso et al. 2005). Es ist unklar, inwieweit genetische bzw. Umweltfaktoren das unterschiedliche Auftreten der NET in Abhängigkeit des Geschlechts bedingen.

Das Alter der Patienten in meinem Tumorkollektiv zum Zeitpunkt der Operation stieg mit Zunahme der WHO-Gruppe tendenziell an. Das durchschnittliche Alter der Patienten mit einem NET der *WHO-Gruppe 3* lag zum Zeitpunkt der Operation bei 73,2 Jahren ($\pm 12,2$ Jahre). Die Patienten mit einem NET der *WHO-Gruppe 1 bzw. 2* waren mit einem Alter von 61,1 Jahren (13,2 Jahren) bzw. 63,4 Jahren (13,9 Jahren) jünger. Es bleibt zu prüfen, ob schlechtere DNA-Reparaturmechanismen ältere Patienten empfänglicher für die Persistenz von Mutationen machen, die wenig differenzierte neuroendokrine Karzinome induzieren.

4.3 Histologische Darstellung der Tumoren und des Tumorstromas

4.3.1 Histologische Tumormarker

Zur Charakterisierung des Tumorkollektivs wurden die histologischen Tumormarker Chromogranin A, CD56 und S100 verwendet.

Chromogranin A war in 81,5 % der Fälle in meinem Tumorkollektiv positiv (*Dünndarm*: 87,5 %, *Kolorektum*: 53,9 %, *Pankreas*: 100 %).

NET des *Mitteldarms*, zu denen die Präparate des *Dünndarms* aus meinem Kollektiv mit Ausnahme des *Duodenums* und des *proximalen Jejunums* gezählt werden können, exprimieren gewöhnlich Chromogranin (Al-Khafaji et al. 1998). Chromogranin A war in einer immunhistochemischen Analyse über Karzinoide und endokrine pankreatische Tumoren in allen Tumoren des *Pankreas* nachweisbar (Kimura et al. 2000).

Die Präparate des *Dünndarms* zeigten einen signifikant ($p < 0,01$) höheren „Score“ für Chromograninpositivität als die Präparate des *Kolorektums*. Meine Ergebnisse entsprechen einer Analyse über die Expression von Chromogranin in Karzinoiden und pankreatischen endokrinen Tumoren, in der nur 7 von 29 Karzinoiden des *Rektums* (24,1 %) eine Positivität für Chromogranin A aufwiesen (Kimura et al. 2000). In einer weiteren immunhistologischen Studie waren nur 2 von 5 Karzinoidpräparaten des *Rektums* (40 %) positiv für Chromogranin (Nash und Said 1986). Eine klinisch-pathologische Studie über kolorektale Karzinoide konnte eine Positivität von 58 % für Chromogranin feststellen (Federspiel et al. 1990). Interessanterweise scheint eine höhere Prävalenz für die Expression von Chromogranin B in den NET des *Rektums* zu bestehen (Kimura et al. 2000). Möglicherweise unterscheiden sich

NET des *Dünndarms* und NET des *Kolorektums* in ihrer neuroendokrinen Differenzierung. Es ist bekannt, dass ein Teil kolorektaler Karzinoide eine Positivität für CEA zeigt (Federspiel et al. 1990). Kolorektale NET wurden dadurch häufig als Adenokarzinome diagnostiziert (Federspiel et al. 1990). Auf der anderen Seite sind Adenokarzinome des Kolorektums in der Lage, Chromogranine durch das Einschalten neuroendokriner Gene zu exprimieren (Pagani et al. 1995). Es ist auffallend, dass kolorektale NET Gemeinsamkeiten zu kolorektalen Adenokarzinomen aufweisen, bzw. als „Mischtumoren“ vorkommen können. In meinem Kollektiv ist die prozentuale Anzahl CD68-positiver Zellen in NET des *Kolorektums* signifikant höher als im *Dünndarm* ($p < 0,01$). Die Anzahl an Makrophagen ist tendenziell höher als im *Pankreas*. Kolorektale Adenokarzinome sind reich an Immunzellen, besonders an Makrophagen, die mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind (Nagorsen et al. 2007). Kolorektale Adenokarzinome sind in der Lage, neuroendokrine Marker wie Chromogranin, NSE und Leu-7 zu exprimieren; umgekehrt können kolorektale NET CEA exprimieren (Federspiel et al. 1990). Sowohl Tumorzellen kolorektaler NET als auch Tumorzellen kolorektaler Adenokarzinome (Ozerhan et al. 2010) zeigen eine Positivität für Fascin. Der „Score“ der Chromograninpositivität in NET der *WHO-Gruppe 3* nahm im Vergleich zu NET der *WHO-Gruppe 2* signifikant ab ($p < 0,01$). Die geringe Differenzierung neuroendokriner Karzinome der *WHO-Gruppe 3* führt auch zum Verlust neuroendokriner Differenzierungsmarker. Möglicherweise sind kolorektale NET, vor allem die wenig differenzierten NET, und kolorektale Adenokarzinome miteinander verwandt.

Es wird angenommen, dass wenig differenzierte NET aus einer anderen Stammzelle entstehen als gut differenzierte NET (Klöppel 2011).

CD56 oder NCAM ist ein histologischer Tumormarker für NET. In meinem Kollektiv nahm der NCAM-„Score“ in größeren Tumoren signifikant zu ($p < 0,01$). Zell-Adhäsionsmoleküle spielen eine Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Tumoren (Onganer et al. 2005). Möglicherweise wird das höhere metastatische Potential größerer NET durch Zelladhäsionsmoleküle wie NCAM unterstützt.

In meinem Tumorkollektiv stellte sich CD56 zu 42,6 % positiv dar (*Dünndarm*: 46,9 %, *Kolorektum*: 7,6 %, *Pankreas*: 88,9 %).

Eine Analyse über die Expression des CD56/NCAM-Antigens kommt zu vergleichbaren Ergebnissen. 58 % der Karzinoide des *Mitteldarms*, zu denen die NET des *Dünndarms* mit Ausnahme des *Duodenums* und *oberen Jejunums* gezählt werden können, stellten sich positiv für CD56 dar. 20 % der Karzinoide des *Hinterdarms*, zu denen die NET des *Kolorektums* gezählt werden können, waren CD56-positiv. 76,5 % der Karzinoide des *Vorderdarms*, zu denen die pankreatischen NET gehören, zeigten eine CD56-Positivität (Al-Khafaji et al. 1998).

Meine Ergebnisse zeigen, dass CD56 nicht als Marker für NET des *Kolorektums* verwendet werden kann. Dies spricht für eine geringere neuroendokrine Differenzierung der kolorektalen NET.

Insgesamt ließ sich eine Positivität von 18,9 % für S100 nachweisen (*Dünndarm*: 14,3 %, *Kolorektum* 28,5 %, *Pankreas* 22,2 %), wobei die positiven Präparate eine sehr schwache Färbung zeigten.

S100 ist als Tumormarker für NET bekannt, findet allerdings wenig Beachtung. In einer bereits zitierten Studie war die Positivität von Karzinoiden des *Vorderdarms* für S100 bei 41 % und die Positivität für Karzinoide des *Mittel-* und *Hinterdarms* für S100 bei 50 % (Al-Khafaji et al. 1998). Im vorliegenden Tumorkollektiv konnte dies nur z.T. gezeigt werden.

Die Datenlage zu S100 als Tumormarker ist gering. S100 kann nicht als adäquater Tumormarker für NET betrachtet werden.

Tab.7: Vergleich der prozentualen Positivität für die untersuchten Tumormarker zwischen in der Literatur beschriebenen neuroendokrinen Tumoren und den NET des untersuchten Tumorkollektivs.

Tumormarker	Positivität im eigenen Tumorkollektiv	Positivität in der Literatur
Chromogranin	NET des <i>Dünndarms</i> : 87,5%	Karzinome des <i>Ileums</i> : 100% (Kimura et al. 2000)
	NET des <i>Kolorektums (Hinterdarm)</i> : 53,9%	Karzinome des <i>Rektums</i> für Chromogranin A: 24,1% (Kimura et al.2000) Karzinome des <i>Kolorektums</i> : 58% (Federspiel et al. 1990)
	NET des <i>Pankreas</i> : 100%	Endokrine Tumoren des <i>Pankreas</i> : 100% (Kimura et al. 2000)
CD56	NET des <i>Dünndarms</i> : 46,9%	Karzinome des <i>Mitteldarms</i> : 58% (Al-Khafaji et al. 1998)
	NET des <i>Kolorektums</i> : 7,7%	Karzinome des <i>Hinterdarms</i> : 20% (Al-Khafaji et al. 1998)
	NET des <i>Pankreas (Vorderdarm)</i> : 88,9%	Karzinome des <i>Vorderdarms</i> : 76,5% (Al-Khafaji et al. 1998)
S100	NET des <i>Dünndarms</i> : 14,3%	Karzinome des <i>Mitteldarms</i> : 50% (Al-Khafaji et al. 1998)
	NET des <i>Kolorektums</i> : 28,5%	Karzinome des <i>Hinterdarms</i> : 50% (Al-Khafaji et al. 1998)
	NET des <i>Pankreas</i> : 22,2%	Karzinome des <i>Vorderdarms</i> : 41% (Al-Khafaji et al. 1998)

4.3.2 Histologische Wachstumsmuster

Die NET des untersuchten Kollektivs stellten sich insgesamt sehr heterogen in Bezug auf ihren histologischen Typus dar. Es zeigten sich sowohl insuläre, trabekuläre, azinäre, diffuse als auch gemischt insulär-azinäre Wachstumsmuster. Während die Tumoren des *Dünndarms* hauptsächlich ein insuläres Wachstum zeigten (59,4 % der Präparate), war im *Kolorektum* vorwiegend ein trabekuläres Wachstumsmuster feststellbar (53,8 % der Präparate). Die Tumoren des *Pankreas* wuchsen zum größten Teil azinär (40 % der Präparate) oder trabekulär (40 % der Präparate). In einer Studie über die Histologie, Histochemie und Immunhistochemie gastrointestinaler Karzinoide war die vorherrschende Wachstumsform für Karzinoide des *Mitteldarms*, zu denen die Präparate des Dünndarms aus meinem Kollektiv mit Ausnahme der Präparate aus dem *Duodenum* und *oberen Jejunum* gezählt werden können, insulär. Für die Karzinoide des *Hinterdarms*, zu denen die Präparate des *Kolorektums* gezählt werden können, war die vorherrschende Wachstumsform trabekulär (Raju und Lee 1988). Für die Karzinoide des *Vorderdarms*, zu denen die Präparate des *Pankreas* aus meinem Kollektiv gehören, war die vorherrschende Wachstumsform ebenfalls trabekulär (Raju und Lee 1988). Bei den Tumoren der *WHO-Gruppe 3* fiel auf, dass fast die Hälfte der Präparate (45,5%) ein diffuses Wachstumsmuster zeigte. Es ist in der Literatur lange bekannt, dass besonders NET mit schlechter Prognose ein diffuses bzw. undifferenziertes Wachstumsmuster zeigen (Johnson et al. 1983). Die schnell proliferierenden Tumorzellen verdrängen die Bindegewebsstränge und zerstören die Architektur des Stromas.

4.3.3 Struktur des Tumorstromas

Die neuroendokrinen Tumoren zeigen ein ausgeprägtes Tumorstroma abhängig von Organlokalisierung und WHO-Gruppierung. Im Tumorstroma war die Anzahl an α -SMA-positiven Zellen am größten. Alle auswertbaren Präparate zeigten eine α -SMA-Positivität. Dabei könnte es sich bei den angefärbten Zellen um Muskelzellen (Pollard et al. 2009), bzw. um Myofibroblasten (Nowak et al. 2009) handeln. Myogene Zellen exprimieren Intermediärfilamente wie das Desmin (Moll et al. 1982). Nur 40,5 % der auswertbaren Präparate des untersuchten Kollektivs zeigten eine Positivität von Desmin zwischen den Tumorzellkomplexen.

Die Tumorzellnester wuchsen in das Muskelgewebe der Darmwand ein. Während die kontraktile Elemente der Muskulatur (α -SMA) weitgehend erhalten blieben, konnte eine geringere Ausprägung der Intermediärfilamente (Desmin) im Vergleich zu den Muskelzellen

beobachtet werden. Möglicherweise reagieren die Intermediärfilamente im Muskelgewebe der NET empfindlicher auf die Verdrängung durch Tumordinfiltration.

Es ist bekannt, dass neuroendokrine Tumoren ein Stroma aufweisen, das durch Fibrose gekennzeichnet ist. NET können durch fibrotische Reaktionen in der Bauchhöhle zu einem Darmverschluss oder im Falle der NET des *Mitteldarms* zu Fibrosen am Endokard führen (Chaudhry et al. 1993). In anderen neuroendokrinen Tumoren, wie z.B. dem C-Zell-Karzinom der Schilddrüse ließen sich u.a. einige, für Myofibroblasten spezifische Marker wie FAP α („fibroblast-activation-protein- α “), Tn-C („tenascin-C“) und α -SMA sowohl intratumoral als auch peritumoral detektieren (Koperek et al. 2007). Weiterhin ist in der Literatur bekannt, dass NET eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren exprimieren, die Fibroblasten aktivieren können. Hierzu gehören u.a. TGF- β („tumor-growth-factor- β “), bFGF („fibroblast-growth-factor“) und PDGF („platelet-derived-growth-factor“) (Chaudhry et al. 1993). Es sieht so aus, als seien vom Tumor exprimierte Wachstumsfaktoren in der Entwicklung von Fibroblasten im Stroma gastrointestinaler NET beteiligt (La Rosa et al. 1997). Die Interaktion zwischen Myo-/Fibroblastenzellen und Tumorzellen spielt in NET eine Rolle.

Die Unterschiede in der Zusammensetzung des Tumorstromas zwischen NET der *WHO-Gruppen 1 und 2* bzw. NET der *WHO-Gruppe 3* waren offensichtlich. NET der *WHO-Gruppen 1 und 2* zeigten regelmäßig lange und breite Aktinbündel mit vereinzelt etwas schmalere Desmin-Strängen. Dagegen wiesen NET der *WHO-Gruppe 3* unregelmäßige, kurze und schmale Aktin-Bündel und selten Desminstränge auf. In wenig differenzierten NET sind die Tumorzellen in ein gering ausgeprägtes Tumorstroma eingebettet. Stattdessen findet sich hier eine hohe Anzahl an Immunzellen. Interessanterweise ist in der Literatur bekannt, dass intakte Fibroblastenschichten das Tumorstroma in NET der *WHO-Gruppe 3* gestört. Möglicherweise fördert das defekte Tumorstroma das Tumorstroma und damit Metastasierungsprozesse.

Fascin war ebenfalls regelmäßig in den NET des untersuchten Kollektivs detektierbar. Allerdings stellten sich sowohl Zellen in den Bindegewebszügen des Stromas als auch Gefäßwände und sogar vereinzelt Tumorzellen positiv dar. Über Fascin in gastroenteropankreatischen NET ist in der Literatur nichts bekannt. Es existiert eine Studie, die Fascin als unabhängigen Prognosefaktor für Lymphknotenmetastasen in pulmonalen Tumoren mit neuroendokriner Differenzierung identifizieren konnte (Pelosi et al. 2003).

Fascin ist auch ein Marker für reife, dendritische Zellen (Al-Alwan et al. 2001). Die zellulären Ausläufer, die bei den Fascin-positiven Zellen im Stroma der NET entdeckt werden konnten, und die starke Präsenz Kim1p-positiver Zellen zwischen den Tumorzellkomplexen sprechen für ein Auftreten dendritischer Zellen im Stroma der NET. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Fascin als Gefäßmarker in NET fungiert. Es ist bekannt, dass Fascin auf Endothelzellen

detektierbar ist (Pinkus et al. 1997). Ungewöhnlich scheint die Expression von Fascin durch die Tumorzellen des untersuchten NET-Kollektivs. Es handelte sich dabei jedoch lediglich um vier Präparate, die zudem alle histologisch zu den wenig differenzierten NET gehörten. Das Phänomen Fascin-positiver Tumorzellen konnte in anderen Tumorentitäten beobachtet werden, u.a. im kolorektalen Karzinom (Ozerhan et al. 2010). Das Vorkommen Fascin-positiver Tumorzellen verdeutlicht die histologischen Gemeinsamkeiten zwischen wenig differenzierten kolorektalen NET und kolorektalen Adenokarzinomen. Fascin scheint für die Motilität der Tumorzellen und für die Metastasierung eine entscheidende Rolle zu spielen, indem es die Konfiguration der Tumorzellen verändert (Hashimoto et al. 2007). Möglicherweise ist es auch in den NET an der Metastasierung der Tumoren beteiligt.

Der Anti-CD34-Antikörper wird in der Literatur als Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen (Kiernan et al. 2009), und als Marker für Endothelzellen beschrieben (Asahara et al. 1997). Hämatopoetische Vorläuferzellen konnten nicht detektiert werden. Es existiert eine Studie, die CD34-positive Stroma-Zellen in Karzinoiden des *Rektums* nachwies. Es wurde in dieser Studie postuliert, dass die Detektion CD34-positiver Stroma-Zellen von der Größe der NET abhängig sein könnte (Kuroda et al. 2005). CD34 war in meiner Studie Marker für Gefäß-Endothelzellen. NET sind als gefäßreiche Tumoren bekannt. Sie exprimieren u.a. VEGF-Rezeptoren („vascular-endothelial-growth-factor“-Rezeptoren). Darüber hinaus ist auch ihr Ligand, das VEGF in NET nachweisbar (Besig et al. 2009).

vWF kann als Gefäßmarker gesehen werden, da er von Endothelzellen synthetisiert wird (McGrath et al. 2010). An den exemplarischen Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass vWF in den Endothelien der NET des *Dünndarms* vorkommt.

Tendenziell waren die NET des *Pankreas* gefäßreicher. Die Anzahl an Gefäßen in NET der *WHO-Gruppe 3* variierte. Für ileale Karzinoide ist bekannt, dass die mikrovaskuläre Dichte mit zunehmender Malignität sinkt (Besig et al. 2009). Einige NET der *WHO-Gruppe 3* in meinem Kollektiv zeigten inhomogene Gefäßwände. Es ist bekannt, dass die Gefäßarchitektur in Tumoren gestört sein kann. Die Wände von Tumorgefäßen haben Öffnungen (Fenton et al. 2005). Ihnen fehlen Perizyten und glatte Muskulatur. Die Auskleidung der Blutgefäße in Tumoren enthält ein Mosaik von Endothel- und Tumorzellen. Die Auskleidung der Gefäße durch Tumorzellen wird als „vaskuläres Mimikry“ bezeichnet (Fenton et al. 2005). Möglicherweise liegt in einigen NET der *WHO-Gruppe 3* ein „vaskuläres Mimikry“ vor. Die Positivität von Fascin in Tumorzellen der *WHO-Gruppe 3* spricht dafür, dass Endothelzellen und Tumorzellen in NET der *WHO-Gruppe 3* nicht eindeutig unterschieden werden können. Die Gefäßarchitektur in NET der *WHO-Gruppe 3* ist gestört.

4.4 Darstellung der Immunzellen

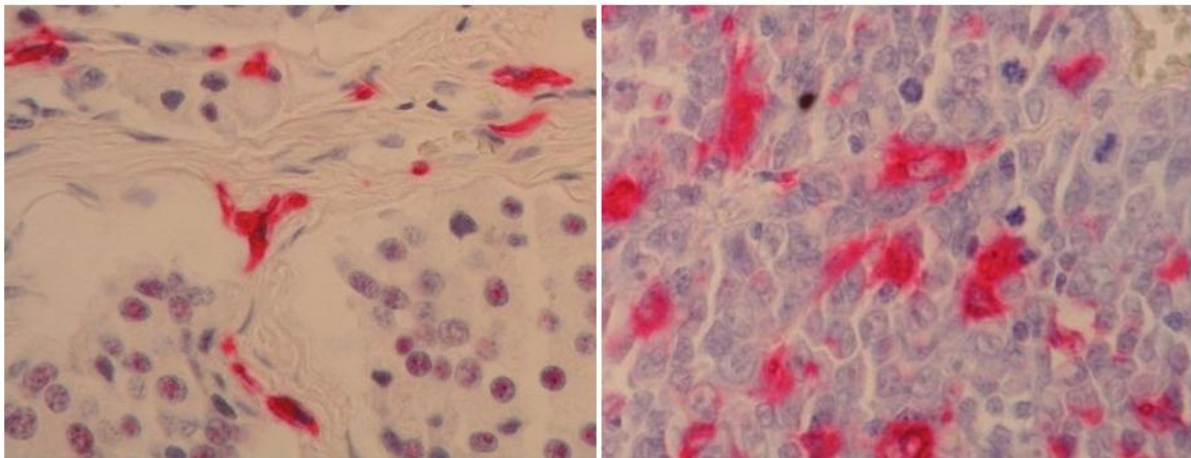
4.4.1 Morphologie und qualitative Darstellung der Immunzellen

Unter den Kim1p-positiven Zellen befanden sich sowohl Zellen mit den typischen Ausläufern dendritischer oder fibrohistiozytärer Zellen, als auch plumpere Zellen, die am ehesten Gewebsmakrophagen entsprechen. Die Morphologie der Kim1p-positiven Zellen unterschied sich in Abhängigkeit der WHO-Gruppe: Kim1p-positive Zellen in Tumoren der *WHO-Gruppe 3* hatten ein plumpes Erscheinungsbild und ähnelten größtenteils Makrophagen; Kim1p-positive Zellen in NET der *WHO-Gruppen 1 und 2* zeigten die typischen Kennzeichen dendritischer Zellen.

Abb. 54: Repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, Kim1p-Färbung, 400fache Originalvergrößerung

A Dünndarm WHO-Gruppe 2

B Kolorektum WHO-Gruppe 3



A zeigt Kim1p-positive Zellen im Tumorstroma eines NET der *WHO-Gruppe 2* (Ki-67-Proliferationsindex=0,1 %): Das Tumorstroma ist deutlich von den Tumorzellen abgrenzbar. Die Dichte gefärbter Zellen ist im Vergleich zu Bild B geringer. Die Kim1p-positiven Zellen sind im Vergleich zu Bild B kleiner und imponieren langgestreckt. Die gefärbte Zelle in der Bildmitte zeigt deutlich Zellausläufer. B zeigt Kim1p-positive Zellen im Tumorstroma eines NET der *WHO-Gruppe 3* (Ki-67-Proliferationsindex=40,8 %): Das Tumorstroma ist kaum vorhanden. Die Dichte gefärbter Zellen ist im Vergleich zu Bild A höher. Die Kim1p-positiven Zellen sind im Vergleich zu Bild A größer und haben eine rundliche Morphologie mit diffusen Zellausläufern. Die Zellen treten in Kontakt mit den Tumorzellen bei deutlich verringertem Tumorstroma.

Die Zellen mit Ausläufern sprechen dafür, dass sich eine Subpopulation dendritischer Zellen in den NET befindet. Dendritische Zellen spielen in vielen Tumoren eine Rolle (Bergeron et al. 2006, Kara et al. 2009, Sandel et al. 2005, Vermi et al. 2003). In einer Studie über dendritische Zellen in Melanomen konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen Tumorantigene aufnehmen und T-Zellen präsentieren können (Preynat-Seuve et al. 2006). Dendritische Zellen können nach Antigenkontakt in lymphatisches Gewebe einwandern (Banchereau und Steinman 1998). Es stellt sich die Frage, wie der Aktivierungsstatus der dendritischen Zellen in den NET ist. Es gibt auf der einen Seite die unreifen dendritischen Zellen, die CD1a (Bell et al. 1999) und S100 (Sandel et al. 2005) exprimieren und auf der anderen Seite die reifen dendritischen Zellen, die Oberflächenantigene wie CD83 und DC-LAMP exprimieren (Bell et al. 1999), um Lymphozyten stimulieren zu können. Mit Antigen beladene unreife dendritische Zellen sind in der Lage, eine T-Zellantwort zu unterdrücken (Steinman et al. 2003). Sie können eine regulatorische T-Zell-Antwort induzieren (Yamazaki et al. 2008). Im Brustkrebs zum Beispiel schien ein Vorliegen von reifen dendritischen Zellen gegenüber unreifen dendritischen Zellen mit einer besseren Prognose verbunden zu sein (Iwamoto et al. 2003).

Der Status der dendritischen Zellen in meinem Kollektiv bleibt unklar. Allerdings zeigten einige Zellen im Stroma der NET meines Kollektivs eine Positivität für S100. Diese Positivität wurde allerdings nicht quantitativ ausgewertet, da S100 darüber hinaus als Tumormarker bei NET bekannt ist (Al-Khafaji et al. 1998). Die überwiegende Anzahl der Tumorzellen im NET-Kollektiv war S100-negativ. Somit könnte die S100-Positivität auf die Unreife einiger dendritischer Zellen hinweisen. S100 wird als Marker für unreife Zellen kontrovers diskutiert. Er gilt zum Beispiel im Kolonkarzinom nicht als absolut „exklusiver“ Marker (Nagorsen et al. 2007). S100-positive Zellen in NET der Lunge zeigten weder CD68- noch CD1a-Positivität (Gosney et al. 1999). Es wird angenommen, dass es sich bei den S100-positiven Zellen um sogenannte „sustentacular cells“ handelt, die mit Schwann-Zellen verwandt sein könnten (Gosney et al. 1999). Das regelmäßige Vorkommen von Fascin-positiven Zellen spricht für das Vorhandensein dendritischer Zellen. Fascin ist mit der Ausreifung dendritischer Zellen assoziiert (Al-Alwan et al. 2001).

Bei den Zellen mit plumperem Aussehen könnte es sich um Makrophagen handeln. Die Zellmorphologie ähnelte der der Makrophagen, die mit dem anti-CD68-Antikörper angefärbt wurden; wobei CD68-positive Zellen quantitativ eine vergleichsweise untergeordnete Rolle in den NET spielten. Makrophagen und dendritische Zellen sind eng miteinander verwandt. Monozyten können sich in Abhängigkeit bestimmter Zytokinsignale sowohl in Makrophagen als auch in dendritische Zellen differenzieren (Chomarat et al. 2000). Makrophagen spielen in anderen Tumoren eine überragende Rolle (Lewis und Pollard 2006, Nagorsen et al. 2007). Dabei scheinen hauptsächlich M2-Makrophagen für die protumorösen Eigenschaften

verantwortlich zu sein (Solinas et al. 2009). Sie sind beteiligt an der Invasion, der Metastasierung und an der Angiogenese von Tumoren. Oft sind Tumoren, die eine hohe Makrophagen-Infiltration aufweisen, mit einer schlechten Prognose verbunden (Solinas et al. 2009). Dies konnte z.B. für Brustkrebs gezeigt werden (Leek et al. 1996).

Zytotoxische T-Zellen sind an der Detektion und Zerstörung von Tumorzellen beteiligt (Gorelik und Flavell 2001). Die Interaktion zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen ist u.a. im kolorektalen Karzinom von Bedeutung (Nagorsen et al. 2007). Eine hohe Anzahl an Lymphozyten spricht in vielen Tumoren für eine bessere Prognose (Clemente et al. 1996, Naito et al. 1998, Sato et al. 2005, Zhuang et al. 2009). Wie ich zeigen konnte, spielen T-Zellen in NET eine Rolle. Wie bereits erwähnt, haben sie möglicherweise einen Einfluss auf die Prognose. Da CD3-positive Zellen in NET der *WHO-Gruppe 3* signifikant häufiger vorkommen als in NET der *WHO-Gruppe 2* sind sie am ehesten mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Unklar bleibt, ob es sich bei den CD3-positiven Zellen um zytotoxische oder regulative Zellen handelt. Eine Studie zur Analyse des Immunstatus bei Patienten mit einem Karzinoid des Mitteldarms zeigte eine höhere Frequenz von regulativen T-Zellen im Blut verglichen mit Gesunden (Vikman et al. 2009). Bei den CD3-positiven Zellen im Tumorstroma der NET meines Kollektivs könnte es sich daher um regulative T-Zellen handeln, die möglicherweise zytotoxische T-Zellen bei der Lyse von Tumorzellen hemmen. Inwieweit eine erhöhte Anzahl an CD3-positiven Zellen mit einer schlechteren Prognose einhergehen könnte, bleibt zu überprüfen.

B-Zellen waren in den NET kaum oder gar nicht vorhanden. Ihre Funktion kann vernachlässigt werden. Dies ist vergleichbar mit in der Literatur beschriebenen anderen soliden Tumoren, in denen B-Zellen keine Rolle bei der Tumorbekämpfung spielen. Sie sind eher indirekt bei der Aufrechterhaltung von chronischen Entzündungsprozessen als Risikofaktor für die Entstehung von Tumoren beteiligt (De Visser et al. 2005). Die Abwesenheit von B-Zellen spricht für die These, dass die Immunzellen in NET nicht in ein entzündliches Milieu eingebettet sind. In gastrointestinalen Stromatumoren konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Immunzellen kein entzündliches Milieu darstellen (Cameron et al. 2008). Das Vorkommen bzw. die Abwesenheit bestimmter Zytokinmuster, die für ein entzündliches Milieu typisch sind, konnte in meiner Untersuchung nicht gezeigt werden, da die Präparate für eine quantitative RNA-Analyse nicht geeignet waren.

Immunzellen in NET der *WHO-Gruppen 1 und 2* haben durch das ausgeprägte Stroma kaum Kontakt zu den Tumorzellen. Immunzellen in NET der *WHO-Gruppe 3* treten in einem aufgelockerten Tumorstroma vereinzelt in direkten Kontakt zu den Tumorzellen. Möglicherweise können die Tumorzellen durch den engen Kontakt besser mit Wachstumsfaktoren versorgt werden. Darüber hinaus füllen die Immunzellen die Lücken

zwischen den Tumorzellnestern aus, die durch den Verlust an Bindegewebssträngen in Tumoren mit geringer Differenzierung entstehen. Die Immunzellen in NET mit geringer Differenzierung ersetzen somit das fehlende bindegewebige Gerüst.

4.4.2 Quantitative Darstellung der Immunzellen

Kim1p-positive Zellen waren in allen Organlokalisationen und WHO-Gruppen signifikant häufiger ($p < 0,01$) als CD3-positive, CD68-positive und CD20-positive Zellen.

Die Unterschiede zwischen den Organlokalisationen waren gering. Zwischen *Dünndarm* und *Pankreas* gab es kaum Unterschiede. Zwischen *Dünndarm* und *Pankreas* konnten keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Immunzellen nachgewiesen werden.

In den NET des *Kolorektums* war die prozentuale Anzahl aller Immunzellen tendenziell höher als die prozentuale Anzahl der Immunzellen im *Dünndarm* und *Pankreas*. Im *Kolorektum* waren signifikant mehr CD68-positive Zellen als im *Dünndarm* ($p < 0,01$). Wie bereits in Kapitel 4.3.1 dargestellt, unterscheiden sich NET des *Kolorektums*, vor allem die wenig differenzierten NET des *Kolorektums*, von den NET des *Pankreas* und *Dünndarms*. Die höhere Anzahl an Immunzellen, die für CD68 signifikant war, ist charakteristisch für die Ähnlichkeiten mit kolorektalen Adenokarzinomen, die ein ausgeprägtes Stroma mit einer Vielzahl an Immunzellen zeigen (Ropponen et al. 1997, Sandel et al. 2005, Suzuki et al. 2002, Xie et al. 2006).

Deutliche Unterschiede in der Verteilung der Immunzellen bestanden zwischen den WHO-Gruppen. Mit steigender WHO-Gruppe erhöhte sich die prozentuale Anzahl Kim1p-positiver Zellen (*WHO-Gruppe 1*: $7,6/\pm 3,7$; *WHO-Gruppe 2*: $19,9/\pm 8,7$; *WHO-Gruppe 3*: $28,1/\pm 11,6$). Die Unterschiede zwischen NET der *WHO-Gruppen 1 und 3* bzw. die Unterschiede zwischen NET der *WHO-Gruppen 1 und 2* waren für die WHO-Klassifikation von 2000 signifikant ($p < 0,01$). Die aggressiveren Tumoren meines NET-Kollektivs zeigten eine höhere Prozentzahl infiltrierender Kim1p-positiver Zellen.

Die prozentuale Anzahl Kim1p-positiver, ins Tumorstroma infiltrierender Zellen, könnte somit prognostische Relevanz haben.

Mit zunehmender Tumorgröße stieg die prozentuale Anzahl Kim1p-positiver Zellen signifikant an ($p < 0,01$). Es kann angenommen werden, dass größere, wenig differenzierte Tumoren für die Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels eine größere Bandbreite an Wachstumsfaktoren benötigen. Immunzellen, insbesondere Kim1p-positive Zellen, könnten den erhöhten Bedarf an Wachstumsfaktoren abdecken.

CD3-positive Zellen waren in NET der *WHO-Gruppe 3* mit 9,6 % ($\pm 9,1$ %) häufiger vertreten als CD3-positive Zellen in NET der *WHO-Gruppe 1* (4,2 %/ $\pm 3,3$ %) und als CD3-positive Zellen in NET der *WHO-Gruppe 2* (3,4 %/ $\pm 2,7$ %). Die Unterschiede für NET der *WHO-Gruppe 2* und NET der *WHO-Gruppe 3* waren für die WHO-Klassifikation von 2000 signifikant ($p < 0,01$). CD3-positive Zellen könnten prognostische Relevanz haben. Wie bereits in Kapitel 4.4.1 diskutiert, könnte es sich bei den CD3-positiven Zellen um regulative T-Zellen handeln (Vikman et al. 2009).

Die Häufigkeit CD68-positiver Zellen unterschied sich zwischen den WHO-Gruppen. Mit steigender WHO-Gruppe erhöhte sich die prozentuale Anzahl CD68-positiver Zellen (*WHO-Gruppe 1*: 0,1/ $\pm 0,1$; *WHO-Gruppe 2*: 0,8/ $\pm 1,8$; *WHO-Gruppe 3*: 5,8/ $\pm 3,4$). Die Unterschiede zwischen NET der *WHO-Gruppen 1 und 3* bzw. die Unterschiede zwischen NET der *WHO-Gruppen 2 und 3* waren signifikant ($p < 0,01$).

Eine erhöhte Anzahl an TAM sind in verschiedenen Tumoren (Solinas et al. 2009, Leek et al. 1996) für eine schlechte Prognose verantwortlich. Die erhöhte Anzahl CD68-positiver Zellen in NET der *WHO-Gruppe 3* spricht dafür, dass eine erhöhte Anzahl an TAM in NET mit einer schlechteren Prognose einhergehen könnte.

Darüber hinaus stieg mit zunehmender Tumorgöße die Anzahl CD68-positiver Zellen in meinem Kollektiv signifikant ($p < 0,01$) an. Für M2-Makrophagen, denen TAM ähneln, ist die Phagozytose von Zelltrümmern, die bei proliferierenden Tumoren entstehen, und eine Mitwirkung bei der Angiogenese beschrieben (Solinas et al. 2009). Es ist anzunehmen, dass bei größeren und aggressiveren NET eine erhöhte Menge an Zelltrümmern anfällt. Dies erfordert eine erhöhte Phagozytosebereitschaft von Makrophagen, die sich in den Nekrosezonen ansammeln. Makrophagen werden von einer hypoxischen Umgebung angezogen (Solinas et al. 2009). Die bei ilealen Karzinoiden beschriebene, tendenziell geringere mikrovaskuläre Dichte von Tumoren mit erhöhtem malignen Potential (Besig et al. 2009) kann eine Ursache der Hypoxie sein.

CD20-positive Zellen traten in allen WHO-Gruppen in geringer Zahl auf. Signifikante Unterschiede bestanden nicht. CD20-positive Zellen im Tumorstroma der NET sind vernachlässigbar.

Unter Berücksichtigung des Gradings der WHO-Klassifikation von 2000, die der neuen WHO-Klassifikation von 2010 entspricht (Klimstra et al. 2010), lassen sich ebenfalls Unterschiede in der Verteilung der Immunzellen innerhalb der prognostischen Gruppen erkennen. Die Anzahl der Kim1p-, CD3-, und CD68-positiven Zellen steigt mit zunehmendem Tumorgrad an, wobei der Unterschied zwischen *G3-Tumoren* und *G1-Tumoren* für CD68 signifikant ist. Unter Annahme eines Signifikanzniveaus von $\alpha=0,05$ wären die Unterschiede

zwischen *G1-Tumoren* und *G3-Tumoren* für Kim1p bzw. zwischen *G2-Tumoren* und *G3-Tumoren* für CD68 ebenfalls signifikant.

NET mit höherer Proliferationsrate zeigen eine erhöhte Anzahl an Immunzellen, die möglicherweise prognostische Relevanz hat. Möglicherweise kann die Anzahl der Immunzellen als zusätzlicher Marker für die Aggressivität des Tumors gelten. Tumoren mit hoher Proliferationsaktivität brauchen für ihren Stoffwechsel mehr Wachstumsfaktoren. Inwieweit die größere Anzahl an Immunzellen die erhöhte Anzahl an Wachstumsfaktoren für die wenig differenzierten NET bereitstellen kann, bleibt zu überprüfen.

Abb. 55: Repräsentative Darstellung des Tumormikroenvironments eines NET des Dünndarms der WHO-Gruppe 2



- Aktin: —
- Desmin: —
- Fascin: —
- CD34: —
- Kim1p: —
- CD3: —
- CD68: —
- CD20: —

Abb. 56: Repräsentative Darstellung des Tumormikroenvironments eines NET des Dünndarms der WHO-Gruppe 3



- Aktin: —
- Desmin: —
- Fascin: —
- CD34: —
- Kim1p: —
- CD3: —
- CD68: —
- CD20: —

4.5 Interaktion zwischen Tumor und Tumorstroma durch Chemokinrezeptoren

CCR2 wird u.a. von Makrophagen, aktivierten Killerzellen, natürlichen Killerzellen (Mantovani et al. 1999) und Endothelzellen (Salcedo et al. 2000) exprimiert. CCR2 wurde im Zytoplasma bzw. auf der Zellmembran verschiedener Tumoren nachgewiesen (Liang et al. 2008, Lu Y et al. 2007, Van de Broek et al. 2006). CCR2 ist der Rezeptor für CCL2 (MCP1). CCL2 wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen wie Leukozyten, Blutplättchen, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen synthetisiert (Adams und Lloyd 1997). CCL2 spielt die entscheidende Rolle in der Rekrutierung von Monozyten in das Tumorstroma (Solinas et al. 1999). Darüber hinaus ist CCL2 als Tumorstromafaktor bekannt (Lu X und Kang 2009).

Sowohl das Zytoplasma, als auch die Zellmembran der Tumorzellen in den NET zeigten eine CCR2-Positivität. Die CCR2-Positivität unterschied sich abhängig von den Organlokalisationen. Ich konnte zeigen, dass sowohl die NET des *Kolorektums* als auch die NET des *Pankreas* eine signifikant höhere Positivität des CCR2 aufwiesen als die NET des *Dünndarms* ($p < 0,01$).

In einigen Tumoren konnte eine erhöhte apikale Positivität in den randständigen Tumorzellen der einzelnen Tumorinseln gefunden werden. Möglicherweise sind die randständigen Zellen primär an Metastasierungsvorgängen durch den CCR2-Rezeptor beteiligt.

In meinem Kollektiv stellten sich interessanterweise nur die Tumorzellen positiv für CCR2 dar. CCR2 war auf TAM und CD3-positiven Zellen nicht zu detektieren.

Normalerweise wird CCR2 von Makrophagen exprimiert. Es ist bekannt, dass Tumoren CCL2 zur Rekrutierung von Tumor-assoziierten Makrophagen bilden. Das Zusammenspiel zwischen CCR2-positiven Makrophagen und von Tumorzellen produziertem CCL2 kann metastatische Prozesse fördern (Lu X und Kang 2009). Es kann angenommen werden, dass CCR2 auch in den NET aus meinem Tumorkollektiv an der Metastasierung beteiligt ist. Möglich wäre ein autokriner Stimulationsprozess der Tumorzellen, indem die Tumorzelle CCL2 für ihren eigenen Rezeptor bereitstellt.

Das Phänomen, dass Tumorzellen den für die Metastasierung benötigten Liganden selbst produzieren, ist in der Literatur bekannt. Es konnte für das Glioblastom gezeigt werden, dass die Tumorzellen mit hoher CCR2-Expression eine größere Motilität aufwiesen (Liang et al. 2008). Darüber hinaus schienen die Astrozyten im Glioblastom, zumindest teilweise, selber den Liganden für CCR2 zu produzieren (Liang et al. 2008). In den NET aus dem mir vorliegenden Tumorkollektiv wäre ein ähnlicher Prozess denkbar. Das Vorkommen von CCL2 konnte in meiner Untersuchung nicht gezeigt werden, da die Präparate nicht für eine RNA-Analyse geeignet waren.

Gegen die Beteiligung des CCR2 bei der Metastasierung von NET spricht, dass im Tumorkollektiv die CCR2-Positivität in NET mit geringerem Metastasierungspotential zunimmt. NET der *WHO-Gruppe 1* zeigten eine signifikant höhere Positivität für CCR2 als NET der *WHO-Gruppe 2* ($p < 0,01$). Es wäre möglich, dass bei wenig differenzierten NET andere Faktoren für Wachstum und Metastasierung wichtiger werden, wie z.B. der Verlust von E-Cadherin und die Expression von CXCR4 (CXC-Chemokinrezeptor 4) (Arvidsson et al. 2010). In der Literatur gilt CCR2 dennoch als negativer prognostischer Faktor. In einer Studie über CCR2 im Prostatakarzinom nahm die Expression von CCR2 mit höherem Gleason-Score zu (Lu Y et al. 2007). Eine höhere CCR2-Expression war mit einer größeren Tumorprogression assoziiert (Lu Y et al. 2007).

Darüber hinaus kann angenommen werden, dass für die Rekrutierung von Makrophagen in das Tumorstroma der NET andere Mechanismen als die CCR2/CCL2-Achse eine Rolle spielen. Endothelzellen in den NET aus meinem Kollektiv zeigten keine CCR2-Positivität. Die CCR2/CCL2-Achse scheint auf die Angiogenese in den NET meines Kollektivs keinen Einfluss zu haben.

5 Ausblick

Meine Ergebnisse zeigen, dass die Tumorzellen der NET ein ausgeprägtes Tumorstroma besitzen. Die Anzahl dendritischer Zellen nimmt mit der WHO-Gruppe zu. Die prozentuale Anzahl CD3-positiver Zellen ist in NET der WHO-Gruppe 3 signifikant höher als in NET der WHO-Gruppe 2. Die prozentuale Anzahl CD68-positiver Zellen steigt mit Zunahme der WHO-Gruppe an. Sowohl CD3-positive Zellen als auch CD68-positive Zellen könnten damit die Prognose negativ beeinflussen. Die adäquate Zerstörung der Tumorzellen durch T-Zellen und Makrophagen würde ausbleiben. Neuere Therapiekonzepte, die eine Interaktion zwischen Tumorzellen, T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen im Sinne der Tumorzerstörung favorisieren, könnten auch bei NET relevant sein. So könnten u.a. dendritische Zellen zur Immuntherapie bei fortgeschrittenen neuroendokrinen Tumoren nützlich sein (Schott et al. 2003, Schott und Seissler 1999). Catumaxomab, ein neuer Antikörper, der in der Therapie der malignen Aszites getestet wurde, ist ein trifunktionaler, bispezifischer Antikörper, der mit den beiden spezifischen Stellen an EpCam, ein epitheliales Tumorantigen, und an das CD3-Antigen bindet. Mit der Fc-Stelle kann der Antikörper unter anderem an dendritische Zellen und an Makrophagen binden. Die Interaktion von Antikörper und Zellen führt über Apoptose, Freisetzung von Zytokinen, Perforin-induzierte Lyse und die Antikörper-induzierte zelluläre Zytotoxizität zur Zerstörung der Tumorzellen (Sebastian 2010). Andere Therapieansätze richten sich gegen das Tumorstroma und seine Gefäße: Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor Sunitinib das

progressionsfreie Überleben und das Gesamtüberleben von Patienten mit fortgeschrittenen NET des *Pankreas* verlängert (Raymond et al. 2011). Im Tumorkollektiv waren die NET des *Pankreas* tendenziell gefäßreicher. Für ileale Karzinoide ist bekannt, dass die mikrovaskuläre Dichte mit zunehmender Malignität sinkt (Besig et al. 2009). Wieder andere Therapieansätze greifen in die Signalkaskaden, die das Zellwachstum regulieren, ein, wie z.B. der mTOR-Inhibitor Everolimus (Yao et al. 2011). Dies ist möglicherweise besonders effektiv bei fortgeschrittenen NET mit nur wenig ausgeprägtem Stroma.

6 Zusammenfassung

6.1 Einführung

Neuroendokrine Tumoren sind seltene Tumoren mit einer steigenden Inzidenz zwischen 2,0 und 6,5/100.000 Einwohnern (Hauso et al. 2008, Hemminki und Li 2001). Patienten mit NET des *Dünndarms* zeigen häufig keine Beschwerden. Klinisch können sie durch unspezifische Symptome wie abdominelle Schmerzen oder Obstruktion im Sinne eines Subileus auffallen; hepatisch metastasierte neuroendokrine Tumoren können durch das von Diarrhöen, Flush-Anfällen, Bronchokonstriktion und Rechtsherzversagen gekennzeichnete Karzinoid-Syndrom apparent werden (Gustaffson et al. 2008). Nicht-funktionelle NET des *Kolorektums* fallen als Zufallsbefunde in der Kolorektoskopie oder durch das Verursachen von rektalen Blutungen, abdominalen Schmerzen und Stuhlnregelmäßigkeiten auf; nicht-funktionelle pankreatische Tumoren sind häufig Zufallsbefunde in der Bildgebung; funktionelle Tumoren zeigen die für das produzierte Hormon typischen Symptome (Gustaffson et al. 2008).

Die Prognose enteropankreatischer Tumoren ist abhängig von Lokalisation, Invasions- und Metastasierungsfähigkeit, histologischer Differenzierung, Tumorgroße, Proliferationsrate und der Ausbildung eines hormonalen Tumorsyndroms. Die WHO-Klassifikation von 2000 teilt gastroenteropankreatische NET in Abhängigkeit von der Organlokalisierung anhand ihres biologischen Verhaltens in drei prognostische Gruppen ein (Klöppel et al. 2007). Die WHO-Klassifikation von 2010 benutzt den Begriff „neuroendokrine Neoplasie“, teilt die NEN weiter in drei verschiedene prognostische Gruppen ein und verlässt die klinisch etwas umständliche Hybridklassifikation.

Das Tumormikroenvironment der NET wurde bisher nicht untersucht. Für eine große Anzahl von Tumoren konnte ein ausgeprägtes Tumormikroenvironment, in das die Tumorzellen eingebettet sind, nachgewiesen werden (Bell et al. 1999, Clemente et al. 1996, Naito et al. 1998, Sfanos et al. 2009, Cameron et al. 2008). Das Tumorstroma enthält Fibroblasten, Blutgefäßzellen, Immunzellen und extrazelluläre Matrix. Die Interaktion zwischen Tumorstroma und Tumorzellen ist für den Tumorprogress von entscheidender Bedeutung

(Whiteside 2008). Meine Arbeit hat das Ziel, das Tumormikroenvironment enteropankreatischer NET zu beschreiben und Unterschiede abhängig von Organlokalisation und WHO-Gruppe der Tumoren zu erkennen.

6.2 Methoden

55 enteropankreatische NET, von denen 32 aus dem *Dünndarm* (58,2%), 13 aus dem *Kolorektum* (23,6%) und 10 aus dem *Pankreas* (18,2%) stammen, wurden anhand der WHO-Klassifikation für NET von 2000 (Klöppel et al. 2007) in 3 verschiedene prognostische Gruppen eingeteilt. 15 NET fielen in die *WHO-Gruppe 1* (27,3%), 29 in die *WHO-Gruppe 2* (52,7%) und 11 in die *WHO-Gruppe 3* (20%). Von Paraffinblöcken der neuroendokrinen Tumoren wurden Schnitte angefertigt. Um den Tumor selbst zu charakterisieren und um eine Aussage über das Vorhandensein von Myo-/Fibroblasten, Gefäßzellen, Immunzellen und Chemokinrezeptoren im Tumormikroenvironment der NET treffen zu können, wurden die Präparate immunhistochemisch mit Antikörpern gegen Tumormarker (Chromogranin, CD56, S100, Ki-67), Tumorstromamarker (Aktin, Desmin, Fascin, CD34), Immunzellen (Kim1p, CD3, CD68, CD20) und Chemokinrezeptoren (CCR2) gefärbt. vWF wurde exemplarisch mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt.

Für Chromogranin, CD56, S100 und CCR2, die Tumorzellen anfärben, wurde ein computergestützter „Score“ gebildet, der die Positivität des Gewebes widerspiegelt. Die Ergebnisse der Färbung mit den Antikörpern gegen Aktin, Desmin, Fascin, CD34 und vWF wurden morphologisch dargestellt. Kim1p, CD3, CD68 und CD20 als Antikörper zur Detektion von Immunzellen wurden quantitativ mithilfe eines Computerprogramms, das die Anzahl gefärbter Zellen ins Verhältnis zu allen Zellen setzt, analysiert.

6.3 Ergebnisse

Die Tumorzellen der NET zeigen eine typische Tumormarker-Färbung, die größtenteils den Ergebnissen aus der Literatur entspricht (Al-Khafaji et al. 1998, Kimura et al. 2000, Nash und Said 1986, Raju und Lee 1988). Chromogranin (81,5 % Positivität in allen NET des Kollektivs) und CD56 (42,6 % Positivität in allen NET des Kollektivs) spielen als Tumormarker eine Rolle. S100 (18,9 % Positivität in allen NET des Kollektivs) ist als Tumormarker vernachlässigbar. NET des *Dünndarms* zeigen eine signifikant stärkere Chromograninpositivität als NET des *Kolorektums* ($p < 0,01$). NET der *WHO-Gruppe 3* zeigen eine signifikant geringere Chromograninpositivität als NET der *WHO-Gruppe 2* ($p < 0,01$). CD56 ist als Tumormarker für NET des *Kolorektums* (7,7 % Positivität) ungeeignet. Wenig differenzierte NET des *Kolorektums* zeigen eine geringe neuroendokrine Differenzierung.

NET haben ein ausgeprägtes Tumorstroma, das aus Myo-/Fibroblasten, Gefäßzellen, extrazellulärer Matrix und Immunzellen besteht. Aktin ist zu 100 %, Desmin zu 40,5 %, Fascin zu 100 % und CD34 zu 86,5 % nachweisbar. vWF-Faktor färbt Endothelzellen in NET des *Dünndarms*. Die Tumorzellen der NET aus *Dünndarm* und *Kolorektum* wachsen in das Muskelgewebe der Darmwand ein. Dabei werden Intermediärfilamente stärker verdrängt.

Gut differenzierte NET zeigen breite, langgezogene Aktinbündel und gelegentlich etwas dünnere Desminstränge. Wenig differenzierte NET besitzen ein aufgelockertes, schmales Stroma mit dünnen und kurzen Aktinfasern und nur vereinzelt Desmin (18,2 % Positivität). Die gestörte Architektur des Tumorstromas in NET der *WHO-Gruppe 3* fördert möglicherweise das Tumorwachstum und Metastasierungsprozesse. Der Fascin-Antikörper färbt dendritische Zellen und Gefäße in allen NET und Tumorzellen in wenig differenzierten NET. CD34 ist ein zuverlässiger Gefäßmarker. In wenig differenzierten NET zeigen sich die Gefäße teils mit inhomogener Wandstruktur.

Unter den Immunzellen sind Kim1p-positive Zellen am häufigsten (18,2 %), gefolgt von CD3- (4,8 %), CD68- (1,6 %) und CD20-positiven Zellen (0,7 %). In NET der *WHO-Gruppen 1 und 2* befinden sich die Immunzellen in den Bindegewebssträngen zwischen den Tumorzellnestern. In NET der *WHO-Gruppe 3* haben die Immunzellen teilweise engen Kontakt zu den Tumorzellen und ersetzen das gering ausgeprägte Bindegewebe zwischen den Tumorzellen. Tendenziell sind mehr Immunzellen im *Kolorektum* (Kim1p: 21,2 %, CD3: 6,8 %, CD68: 3,9 %, CD20: 1,5 %) als im *Dünndarm* (Kim1p: 16,9 %, CD3: 4,5 %, CD68: 0,8 %, CD20: 0,5 %) und *Pankreas* (Kim1p: 18,5 %, CD3: 3,1 %, CD68: 1,1 %, CD20: 0,3 %) vertreten. CD68-positive Zellen sind im *Kolorektum* signifikant häufiger als im *Dünndarm* ($p < 0,01$).

Mit zunehmender WHO-Gruppe steigt die Anzahl Kim1p- und CD68-positiver Zellen an. Die Unterschiede zwischen NET der *WHO-Gruppe 3* und NET der *WHO-Gruppe 1* bzw. die Unterschiede zwischen NET der *WHO-Gruppe 2* und NET der *WHO-Gruppe 1* sind für Kim1p signifikant ($p < 0,01$). Die prozentuale Anzahl CD68-positiver Zellen ist in NET der *WHO-Gruppe 3* signifikant höher als in NET der *WHO-Gruppen 1 und 2* ($p < 0,01$). Die prozentuale Anzahl CD3-positiver Zellen ist in NET der *WHO-Gruppe 3* signifikant höher als in NET der *WHO-Gruppe 2* ($p < 0,01$). In gut differenzierten NET zeigen Kim1p-positive Zellen eine dendritische Konfiguration. In wenig differenzierten NET zeigen Kim1p-positive Zellen teils dendritische Fortsätze und eine für Makrophagen typische Morphologie mit breiten und runden Zellen. Die prozentuale Anzahl dendritischer Zellen, T-Zellen und Makrophagen ist möglicherweise ein negativer prognostischer Faktor in enteropankreatischen NET.

Die Anzahl Kim1p- und CD68-positiver Zellen steigt mit zunehmender TumorgroÙe signifikant an ($p < 0,01$). Größere und wenig differenzierte NET decken ihren überproportional erhöhten Bedarf an Wachstumsfaktoren und phagozytierenden Zellen möglicherweise durch eine erhöhte Rekrutierung von Immunzellen.

Die Tumorzellen der NET zeigen eine Positivität für CCR2. Der Grad der CCR2-Positivität ist in NET der *WHO-Gruppe 1* signifikant höher als in NET der *WHO-Gruppe 2* ($p < 0,01$). CCR2 ist möglicherweise über einen autokrinen Mechanismus an der Metastasierung beteiligt. Die prognostische Relevanz ist unklar.

Meine Ergebnisse zeigen insgesamt deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung des Tumormikroenvironments zwischen gut differenzierten und wenig differenzierten NET, was auf einer unterschiedlichen Herkunft der Tumorstammzellen beruhen könnte (Klöppel 2011).

Es stellt sich die Frage, ob ein Umschlagspunkt existiert, an dem sich gut differenzierte neuroendokrine Karzinome in wenig differenzierte NET transformieren und inwiefern die Therapie bzw. der Einfluss des Tumorstromas eine Rolle bei der Transformation spielen. Darüber hinaus bleibt zu klären, ob es NET gibt, die sich a priori als wenig differenzierte Tumoren präsentieren. Dies würde auf eine unterschiedliche Herkunft der Tumorstammzellen hinweisen.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Graphische Darstellung der Antikörperbindung	23
Abb. 2: Beispiele für Immunfluoreszenzbilder in unterschiedlichen Kanälen, 200fache Originalvergrößerung, Visualisierung der Antikörperfärbung gegen 4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) und CD3 (cy3)	35
Abb. 3: Beispiel für die computergestützte Markierung, 100fache Originalvergrößerung	36
Abb. 4: Darstellung der unterschiedlichen Färbungsintensitäten anhand von Chromograninfärbungen, 100fache Originalvergrößerung	37
Abb. 5: Verteilung der NET in Abhängigkeit der Organlokalisation	39
Abb. 6: Verteilung der NET in Abhängigkeit des embryologischen Ursprungs	39
Abb. 7: Verteilung der NET in Abhängigkeit der WHO-Klassifikation von 2000	40
Abb. 8: Verteilung der NET in Abhängigkeit des Gratings (Ki-67-Proliferationsindex) nach den Konsensus-Konferenzen von Frascati (Rindi et al. 2006b, 2007, Klöppel et al. 2007), entsprechend der Einteilung in die drei prognostischen Gruppen (NEN-G1, NEN-G2, NEC-G3) nach der WHO-Klassifikation von 2010	40
Abb. 9: Darstellung der maximalen durchschnittlichen Tumorgröße der NET in Abhängigkeit von der Lokalisation	41
Abb. 10: Darstellung der maximalen durchschnittlichen Tumorgröße der NET in Abhängigkeit von der WHO-Gruppe	42
Abb. 11: Altersverteilung nach Organen	44
Abb. 12: Altersverteilung nach WHO-Gruppen	44
Abb. 13: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der Organlokalisation für Chromogranin	45
Abb. 14: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der WHO-Gruppe für Chromogranin	46
Abb. 15: Chromogranin, repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, 100fache Originalvergrößerung	47

Abb. 16: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der Organlokalisierung für CD56	48
Abb. 17: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der WHO-Gruppe für CD56	49
Abb. 18: Beispiel für CD56 als Marker für Tumorzellen, Dünndarm, 100fache Originalvergrößerung	49
Abb. 19: Beispiel für CD56 als Marker für NK-Zellen (seltenes Bild), Kolorektum, 100fache Originalvergrößerung	50
Abb. 20: CD56/NCAM, repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, 100fache Originalvergrößerung	51
Abb. 21: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der Organlokalisierung für S100	52
Abb. 22: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der WHO-Gruppe für S100	53
Abb. 23: Beispiel für S100 als Marker für dendritische Zellen im Tumorstroma (seltenes Bild in Bezug auf die große Anzahl positiver Zellen), Pankreas, 100fache Originalvergrößerung	53
Abb. 24: S100, repräsentative Darstellung, 100fache Vergrößerung.	54
Abb. 25: Verteilung aller NET in Abhängigkeit des histologischen Wachstumsmusters	56
Abb. 26: Beispiel für insuläres Wachstumsmuster, Dünndarm, 100fache Originalvergrößerung	56
Abb. 27: Beispiel für azinäres Wachstumsmuster, Dünndarm, 100fache Originalvergrößerung	57
Abb. 28: Beispiel für trabekuläres Wachstumsmuster, Dünndarm, 100fache Originalvergrößerung	57
Abb. 29: Beispiel für diffuses Wachstumsmuster, Dünndarm, 100fache Originalvergrößerung	58
Abb. 30: Beispiel für die überwiegend kräftig gefärbten, breiten und langen Aktinbündel im Dünndarm, 100fache Originalvergrößerung	59

Abb. 31: Beispiel für die Anfärbung von Gefäßen im Kolorektum, 100fache Originalvergrößerung	59
Abb. 32: α -SMA, repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, 100fache Vergrößerung	61
Abb. 33: Beispiel für die unterschiedliche Ausprägung der Färbung von Aktin und Desmin im Dünndarm (links: Aktin, rechts Desmin, selbes Präparat), 100fache Originalvergrößerung	62
Abb. 34: Desmin, repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, 100fache Originalvergrößerung	64
Abb. 35: Beispiel für Fascin als Marker für dendritische Zellen und Gefäße, Pankreas, 100fache Originalvergrößerung	66
Abb. 36: Beispiel für Fascin als Marker für Tumorzellen, Dünndarm, 100fache Originalvergrößerung	66
Abb. 37: Fascin, Repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, 100fache Originalvergrößerung	67
Abbildung 38: Abb. 38: CD34, repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, 100fache Originalvergrößerung	69
Abb. 39: vWF, repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten in der Immunfluoreszenzfärbung, 200fache Originalvergrößerung	70
Abb. 40: Kim1p, 100fache Originalvergrößerung, Beispiel für die unterschiedliche Morphologie; links: Kim1p-positive Zellen mit den für dendritische Zellen typischen Zellausläufern, rechts: Kim1p-positive Zellen von vorwiegend runder, plumper Gestalt ohne charakteristische Ausläufer	71
Abb. 41: CD3, 100fache Originalvergrößerung	71
Abb. 42: CD68, 100fache Originalvergrößerung	71
Abb. 43: CD20, 100fache Originalvergrößerung	72
Abb. 44: Die Abbildung fasst die Unterschiede in der prozentualen Anzahl der Immunzellen bezüglich der Organlokalisation zusammen.	74
Abb. 45: Die Abbildung fasst die Unterschiede in der prozentualen Anzahl der Immunzellen bezüglich der WHO-Gruppe zusammen, entsprechend der WHO-Klassifikation von 2000.	75

Abb. 46: Die Abbildung fasst die Unterschiede in der prozentualen Anzahl der Immunzellen bezüglich des Gradings nach den Konsensus-Konferenzen von Frascati zusammen (Rindi et al. 2006b, 2007, Klöppel et al. 2007), entsprechend der WHO-Klassifikation von 2010 (Klimstra et al. 2010)	76
Abb. 47: Repräsentative Kim1p-Schnitte, 100fache Vergrößerung	77
Abbildung 48: Repräsentative CD3-Schnitte, 100fache Vergrößerung	78
Abbildung 49: Repräsentative CD68-Schnitte, 100fache Vergrößerung	79
Abb. 50: Repräsentative CD20 Schnitte, 100fache Vergrößerung	80
Abb. 51: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der Organlokalisierung für CCR2	81
Abb. 52: Prozentuale Verteilung der Färbungsgrade in Abhängigkeit der WHO-Gruppe für CCR2	82
Abb. 53: CCR2, repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, 100fache Originalvergrößerung	83
Abb. 54: Repräsentative Darstellung von Paraffinschnitten, Kim1p-Färbung, 400fache Originalvergrößerung	94
Abb. 55: Repräsentative Darstellung des Tumormikroenvironments eines NET des Dünndarms der WHO-Gruppe 2	100
Abb. 56: Repräsentative Darstellung des Tumormikroenvironments eines NET des Dünndarms der WHO-Gruppe 3	101

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab.1: Prognostische Kriterien für NET des Gastrointestinaltrakts nach WHO-Gruppen, entsprechend der WHO-Klassifikation von 2000 (modifiziert nach Klöppel et al. 2007, S.10)	9
Tab.2: Prognostische Kriterien für NET des Pankreas nach WHO-Gruppen, entsprechend der WHO-Klassifikation von 2000 (modifiziert nach Klöppel et al. 2007, S.11)	10
Tab.3: „Grading“-System für neuroendokrine Tumoren (modifiziert nach Klöppel et al. 2007, S.13)	11
	111

Tab.4 WHO-Klassifikation für gastroenteropankreatische NET von 2010 (modifiziert nach Klimstra et al. 2010, S.709)	12
Tab.5 Vergleich der WHO-Klassifikationssysteme für gastroenteropankreatische NET von 2000 und 2010 (modifiziert nach Klöppel 2011, S.2, Klöppel et al. 2007, S.10/11)	13
Tab.6: Darstellung der verwendeten Antikörper	27
Tab.7: Vergleich der prozentualen Positivität für die untersuchten Tumormarker zwischen in der Literatur beschriebenen neuroendokrinen Tumoren und den NET des untersuchten Tumorkollektivs	90

8 Literaturverzeichnis

Adams DH, Lloyd AR (1997): Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 349, 490-495.

Al-Alwan MM, Rowden G, Lee TD, West KA (2001): Fascin is involved in the antigen presentation activity of mature dendritic cells. *J Immunol* 166, 338-345.

Alibaud L, Llobera R, Al Saati T, March M, Delsol G, Rubin B (2000): A new monoclonal anti-CD3epsilon antibody reactive on paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 48, 1609-1616.

Al-Khafaji B, Noffsinger AE, Miller MA, DeVoe G, Stemmermann GN, Fenoglio-Preiser C (1998): Immunohistologic analysis of gastrointestinal and pulmonary carcinoid tumors. *Hum Pathol* 29, 992-999.

Arnold R, Benning R, Neuhaus C, Rolwage M, Trautmann ME (1993): Gastroenteropancreatic endocrine tumours: effect of Sandostatin on tumour growth. The German Sandostatin Study Group. *Digestion* 54, 72-75.

Arnold R, Trautmann ME, Creutzfeldt W, Benning R, Benning M, Neuhaus C, Jürgensen R, Stein K, Schäfer H, Bruns C, Dennler HJ. (1996): Somatostatin analogue octreotide and inhibition of tumour growth in metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumours. *Gut* 38, 430-438.

Arvidsson Y, Bergström A, Arvidsson L, Kristiansson E, Ahlman H, Nilsson O (2010): Hypoxia stimulates CXCR4 signalling in ileal carcinoids. *Endocr Relat Cancer* 17, 303-316.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997): Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964-967.

Auerswald K: Epidemiologie, Diagnostik und Therapie neuroendokriner Tumore in einem chirurgischen Patientengut, Untersuchung anhand eines Patientenkollektivs aus der Klinik für

Chirurgie aus dem Zeitraum 1988 bis 2005. Med. Diss. Lübeck 2008, <http://www.students.informatik.uni-luebeck.de/zhb/ediss653.pdf>.

Bajetta E, Celio L, Ferrario E, Di Bartolomeo M, Denaro A, Dotti K, Mancin M, Bajetta R, Colombo A, Pusceddu S (2007): Capecitabine plus oxaliplatin and irinotecan regimen every other week: a phase I/II study in first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 18, 1810-1816.

Balkwill F, Mantovani A (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.

Banchereau J, Steinman RM (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Bell D, Chomarot P, Broyles D, Netto G, Harb GM, Lebecque S, Valladeau J, Davoust J, Palucka KA, Banchereau J (1999): In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med* 190, 1417-1425.

Bergeron A, El-Hage F, Kambouchner M, Lecossier D, Tazi A (2006): Characterisation of dendritic cell subsets in lung cancer micro-environments. *Eur Respir J* 28, 1170-1177.

Berney DM, Gopalan A, Kudahetti S, Fisher G, Ambroisine L, Foster CS, Reuter V, Eastham J, Moller H, Kattan MW, Gerald W, Cooper C, Scardino P, Cuzick J (2009): Ki-67 and outcome in clinically localised prostate cancer: analysis of conservatively treated prostate cancer patients from the Trans-Atlantic Prostate Group study. *Br J Cancer* 100, 888-93.

Besig S, Volland P, Baur DM, Perren A, Prinz C (2009): Vascular endothelial growth factors, angiogenesis, and survival in human ileal enterochromaffin cell carcinoids. *Neuroendocrinology* 90, 402-415.

Bingle L, Brown NJ, Lewis CE (2002): The role of tumor-associated macrophages in tumor progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* 196, 254-265.

Boenisch T: Färbemethoden; in: Handbuch II immunchemischer Färbemethoden; 3. überarbeitete Auflage; hrsg. v. Naish SJ; Dako Corporation, Carpinteria, Kalifornien, USA 1997, 22-27.

Brown DC, Gatter KC (2002): Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology* 40, 2-11.

Bruna J, Brell M, Ferrer I, Gimenez-Bonafe P, Tortosa A (2007): Ki-67 proliferative index predicts clinical outcome in patients with atypical or anaplastic meningioma. *Neuropathology* 27, 114-120.

Burke AP, Thomas RM, Elsayed AM, Sobin LH (1997): Carcinoids of the jejunum and ileum: an immunohistochemical and clinicopathologic study of 167 cases. *Cancer* 79, 1086-1093.

Cameron S, Ramadori G (2010): Der Beitrag der Gastroenterologie zur Therapie- 15 Jahre Erfahrung: aus der Vielfalt Hoffnung schöpfen. *Glandula NeT, Netzwerk NET (Net) e.v.* 13-10, 49-53.

Cameron S, Haller F, Dudas J, Moriconi F, Gunawan B, Armbrust T, Langer C, Füzesi L, Ramadori G (2008): Immune cells in primary gastrointestinal stromal tumors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20, 327-334.

Campana D, Thompson JS, Amlot P, Brown S, Janossy G (1987): The cytoplasmatic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. *J Immunol* 138, 648-655.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. (1994): Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. 180, 1263-1672.

Chaudhry A, Funa K, Oberg K (1993): Expression of growth factor peptides and their receptors in neuroendocrine tumors of the digestive system. *Acta Oncol* 32, 107-114.

Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK (2000): IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 6, 510-514.

Clemente CG, Mihm MC Jr, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N (1996): Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77, 1303-1310.

Dagouassat M, Suffee N, Hlawaty H, Haddad O, Charni F, Laguillier C, Vassy R, Martin L, Schischmanoff PO, Gattegno L, Oudar O, Sutton A, Charnaux N (2010): Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 secreted by hepatic myofibroblasts promotes migration and invasion of human hepatoma cells. *Int J Cancer* 126, 1095-1108.

Daponte A, Kostopoulou E, Papandreou CN, Daliani DD, Minas M, Koukoulis G, Messinis IE (2008): Prognostic significance of fascin expression in advanced poorly differentiated serous ovarian cancer. *Anticancer Res* 28, 1905-1910.

De Visser KE, Korets LV, Coussens LM (2005): De novo carcinogenesis promoted by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* 5, 411-423.

Dörken B, Möller P, Pezzutto A, Schwartz-Albiez R, Moldenhauer G: B-cell antigens: CD20; in: *Leucocyte Typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference, Vienna, Austria (Feb. 21-25);* hrsg. v. Knapp W, Dörken B, Gilks WR unter Mitarbeit namhafter Autoren; Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 1989, 46-48.

Donato R (2001): S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 637-668.

Du J, Wang H, Zhong C, Peng B, Zhang M, Li B, Huo S, Guo Y (2007): Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody rituximab. *J Biol Chem* 282, 15073-15080.

Duerr EM, Mizukami Y, Ng A, Xavier RJ, Kikuchi H, Deshpande V, Warshaw AL, Glickman J, Kulke MH, Chung DC (2008): Defining molecular classifications and targets in

gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors through DNA microarray analysis. *Endocr Rel Cancer* 15, 243-256.

Ekeblad S, Sundin A, Janson ET, Welin S, Granberg D, Kindmark H, Dunder K, Kozlovacki G, Örlfors H, Sigurd M, Öberg K, Eriksson B, Skogseid B (2007): Temozolomide as monotherapy is effective in treatment of advanced malignant neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res* 13, 2986-2991.

Endl E, Gerdes J (2000): The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 257, 231-237.

Falini B, Flenghi L, Pileri S, Gambacorta M, Bigerna B, Durkop H, Eitelbach F, Thiele J, Pacini R, Cavaliere A, et al. (1993): PG-M1: a new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. *Am J Pathol* 142, 1359-1372.

Fanburg-Smith JC, Auerbach A, Marwaha JS, Wang Z, Santi M, Judkins AR, Rushing EJ (2010): Immunoprofile of mesenchymal chondrosarcoma: aberrant desmin and EMA expression, retention of INI1, and negative estrogen receptor in 22 female-predominant central nervous system and musculoskeletal cases. *Ann Diagn Pathol* 14, 8-14.

Federspiel BH, Burke AP, Sobin LH, Shekitka KM (1990): Rectal and colonic carcinoids. A clinicopathologic study of 84 cases. *Cancer* 65, 135-140.

Fenton RG, Longo DL, Schäfer R, Schwarte-Waldhoff I: Krebszellbiologie und Angiogenese; in: *Harrisons Innere Medizin-Deutsche Ausgabe in Zusammenarbeit mit der Charité*; hrsg. v. Manfred Dietel, Norbert Suttrop, Martin Zeitz unter Mitarbeit namhafter Autoren; Band 1; ABW Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin 2005, 481-492.

Flaberg E, Guven H, Savchenko A, Pavlova T, Kashuba V, Szekely L, Klein G (2012): The architecture of fibroblast monolayers of different origin differentially influences tumor cell growth. *Int J Cancer* (im Druck).

Gao JL, Kuhns DB, Tiffany HL, McDermott D, Li X, Francke U, Murphy PM (1993): Structure and functional expression of the human macrophage inflammatory protein 1 alpha/RANTES receptor. *J Exp Med* 177, 1421-1427.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD (1991): Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 138, 867-873.

Gorelik L, Flavell RA (2001): Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med* 7, 1118-1122.

Gosney JR, Denley H, Resl M (1999): Sustentacular cells in pulmonary neuroendocrine tumours. *Histopathology* 34, 211-215.

Graeme-Cook F, Bhan AK, Harris NL (1993): Immunohistochemical characterization of intraepithelial and subepithelial mononuclear cells of the upper airways. *Am J Pathol* 143, 1416-1422.

Gustafsson BI, Kidd M, Modlin IM (2008): Neuroendocrine tumors of the diffuse neuroendocrine system. *Curr Opin Oncol* 20, 1-12.

Haas M, Dimmler A, Hohenberger W, Grabenbauer GG, Niedobitek G, Distel LV (2009): Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia. *BMC Gastroenterol* 9, 65.

Hart DNJ (1997): Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90, 3245-3287.

Hashimoto Y, Parsons M, Adams JC (2007): Dual actin-bundling and protein kinase C-binding activities of fascin regulate carcinoma cell migration downstream of Rac and contribute to metastasis. *Mol Biol Cell* 18, 4591-4602.

Hasler WL, Owyang C, Wittig BM: Teil 12 Gastrointestinale Erkrankungen; in: Harrison's Innere Medizin, Deutsche Ausgabe in Zusammenarbeit mit der Charité Berlin; hrsg. v. Manfred Dietel, Norbert Suttrop, Martin Zeitz unter Mitarbeit namhafter Autoren; Band 2; ABW Wissenschaftsverlag GmbH, Berlin 2005, 271-294.

Hauso O, Gustafsson BI, Kidd M, Drozdov I, Chan AKC, Modlin IM (2008): Neuroendocrine tumor epidemiology contrasting Norway and North America. *Cancer* 113, 2655-2664.

Hemminki K, Li X (2001): Incidence trends and risk factors of carcinoid tumors: a nationwide epidemiologic study from Sweden. *Cancer* 92, 2204-2210.

Herold G: Neuroendokrine Tumoren (NET) des gastroentero-pankreatischen Systems (GEP); in: Innere Medizin; hrsg. v. Gerd Herold unter Mitarbeit namhafter Autoren; Köln 2008, 472-476.

Hussein MR (2005): Dendritic cells and melanoma tumorigenesis: an insight. *Cancer Biol Ther* 4, 501-505.

Iacobuzio-Donahue, CA: Chapter 12 Gastrointestinal Polyposis Syndromes; in: Gastrointestinal and Liver Pathology; hrsg. v. Christine A. Iacobuzio-Donahue, Elizabeth A. Montgomery; Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia/Pennsylvania 2005, 345-366.

Iacobuzio-Donahue, CA: Chapter 13 Epithelial Neoplasms of the Colorectum; in: Gastrointestinal and Liver Pathology; hrsg. v. Christine A. Iacobuzio-Donahue, Elizabeth A. Montgomery; Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia/Pennsylvania 2005, 367-394.

Iwamoto M, Shinohara H, Miyamoto A, Okuzawa M, Mabuchi H, Nohara T, Gon G, Toyoda M, Tanigawa N (2003): Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 104, 92-97.

Jamali M, Chetty R (2008): Predicting prognosis in gastroentero-pancreatic neuroendocrine tumors: an overview and the value of Ki-67 immunostaining. *Endocr Pathol* 19, 282-288.

Johnson LA, Lavin P, Moertel CG, Weiland L, Dayal Y, Doos WG, Geller SA, Cooper HS, Nime F, Massé S, Simson IW, Sumner H, Fölsch E, Engstrom P (1983): Carcinoids: the association of histologic growth pattern and survival. *Cancer* 51, 882-889.

Jones RL, Salter J, A'Hern R, Nerurkar A, Parton M, Reis-Filho JS, Smith IE, Dowsett M (2009): The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 116, 53-68.

Ju S, Qiu H, Zhou X, Zhu B, Lv X, Huang X, Li J, Zhang Y, Liu L, Ge Y, Johnson DE, Ju S, Shu Y (2009): CD13+CD4+CD25hi regulatory T cells exhibit higher suppressive function and increase with tumor stage in non-small cell lung cancer patients. *Cell Cycle* 8, 2578-2585.

Kaltsas GA, Papadogias D, Makras P, Grossman AB (2005): Treatment of advanced neuroendocrine tumors with radiolabelled somatostatin analogues. *Endocr Relat Cancer* 12, 683-699.

Kara PP, Ayhan A, Caner B, Gultekin M, Ugur O, Bozkurt MF, Usubutun A, Uner A (2009): Analysis of dendritic cells in sentinel lymph nodes of patients with endometrial and patients with cervical cancers. *Int J Gynecol Cancer* 19, 1239-1243.

Karasavidou F, Barbanis S, Pappa D, Moutzouris G, Tzortzis V, Melekos MD, Koukoulis G (2008): Fascin determination in urothelial carcinomas of the urinary bladder: a marker of invasiveness. *Arch Pathol Lab Med* 132, 1912-1915.

Kerk N, Strozyk EA, Pöppelmann B, Schneider SW (2010): The Mechanism of Melanoma-Associated Thrombin Activity and von Willebrand Factor Release from Endothelial Cells. *J Invest Dermatol Epub* 130, 2259-2268.

Kiernan TJ, Boilson BA, Witt TA, Dietz AB, Lerman A, Simari RD (2009): Vasoprotective effects of human CD34+ cells: towards clinical applications. *J Transl Med* 7, 66.

Kimura N, Pilichowska M, Okamoto H, Kimura I, Aunis D (2000): Immunohistochemical expression of chromogranins A and B, prohormone convertases 2 and 3, and amidating enzyme in carcinoid tumors and pancreatic endocrine tumors. *Mod Pathol* 13, 140-146.

Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, Lloyd RV, Suster S (2010): The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas* 39, 707-712.

Klöppel G. (2011): Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer* 18, 1-16.

Klöppel G, Perren A, Heitz PU (2004): The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Ann N Y Acad Sci* 1014, 13-27.

Klöppel G, Rindi G, Anlauf M, Perren A, Komminoth P (2007): Site specific biology and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Virchows Arch* 451, 9-27.

Klöppel G, Rindi G, Perren A, Komminoth P, Klimstra DS (2010): The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: a statement. *Virchows Arch* 456, 595-597.

Koperek O, Scheuba C, Puri C, Birner P, Haslinger C, Rettig W, Niederle B, Kaserer K, Garin Chesa P (2007): Molecular characterization of the desmoplastic tumor stroma in medullary thyroid carcinoma. *Int J Oncol* 31, 59-67.

Krauter J, Hartl M, Hambach L, Kohlenberg A, Gunsilius E, Ganser A, Heil G (2001): Receptor-mediated endocytosis of CD34 on hematopoietic cells after stimulation with the monoclonal antibody anti-HPCA-1. *J Hematother Stem Cell Res* 10, 863-871.

Kuroda N, Nakayama H, Miyazaki E, Toi M, Hiroi M, Enzan H (2005): The distribution of CD34-positive stromal cells and myofibroblasts in colorectal carcinoid tumors. *Histol Histopathol* 20, 27-33.

Lanier LL, Chang C, Azuma M, Ruitenberg JJ, Hemperly JJ, Phillips JH (1991): Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol* 146, 4421-4426.

La Rosa S, Chiaravalli AM, Capella C, Uccella S, Sessa F (1997): Immunohistochemical localization of acidic fibroblast growth factor in normal human enterochromaffin cells and related gastrointestinal tumours. *Virchows Arch* 430, 117-124.

Ledford-Kraemer MR (2010): Analysis of von Willebrand factor structure by multimer analysis. *Am J Hematol* 85, 510-514.

Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL (1996): Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 56, 4625-4629.

Lewis CE, Pollard JW (2006): Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* 66, 605-612.

Li H, Ayer LM, Lytton J, Deans JP (2001): Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts. *J Biol Chem* 278, 42427-42434.

Liang Y, Bollen AW, Gupta N (2008): CC chemokine receptor-2A is frequently overexpressed in glioblastoma. *J Neurooncol* 86, 153-163.

Lu X, Kang Y (2009): Chemokine (C-C motif) ligand 2 engages CCR2⁺ stromal cells of monocytic origin to promote breast cancer metastasis to lung and bone. *J Biol Chem* 284, 29087-29096.

Lu Y, Cai Z, Xiao G, Liu Y, Keller ET, Yao Z, Zhang J (2007): CCR2 expression correlates with prostate cancer progression. *J Cell Biochem* 101, 676-685.

Mantovani A (1999): Chemokines. Introduction and overview. *Chem Immunol* 72, 1-6.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677-686.

Mason DY, Cordell J, Brown M, Pallesen G, Ralfkiaer E, Rothbard J, Crumpton M, Gatter KC (1989): Detection of T cells in paraffin wax embedded tissue using antibodies against a peptide sequence from the CD3 antigen. *J Clin Pathol* 42, 1194-1200.

Matsudaira P (1994): Actin crosslinking proteins at the leading edge. *Semin Cell Biol* 5, 165-174.

McGrath RT, McRae E, Smith OP, O'Donnell JS (2010): Platelet von Willebrand factor--structure, function and biological importance. *Br J Haematol* 148, 834-843.

Mitry E, Baudin E, Ducreux M, Sabourin JC, Rufié P, Aparicio T, Aparicio T, Lasser P, Elias D, Duvillard P, Schlumberger M, Rougier P (1999): Treatment of poorly differentiated neuroendocrine tumours with etoposide and cisplatin. *Br J Cancer* 81, 1351-1355.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R (1982): The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11-24.

Murphy K, Travers P, Walport M: Appendix 1 Immunologists' Toolbox; in: Janeway's Immunobiology; hrsg. v. Murphy K, Travers P, Walport M; Garland Science, Taylor & Francis Group, New York, Abingdon 2008, 735-782.

Nagorsen D, Voigt S, Berg E, Stein H, Thiel E, Loddenkemper C (2007): Tumor-infiltrating macrophages and dendritic cells in human colorectal cancer: relation to local regulatory T cells, systemic T-cell response against tumor-associated antigens and survival. *J Transl Med* 5, 62.

Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ontanil H (1998): CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 58, 3491-3493.

Nash SV, Said JW (1986): Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. A histochemical and immunohistochemical study of epithelial (keratin proteins, carcinoembryonic antigen)

and neuroendocrine (neuron-specific enolase, bombesin and chromogranin) markers in foregut, midgut, and hindgut tumors. *Am J Clin Pathol* 86, 415-422.

Nicolas MM, Tamboli P, Gomez JA, Czerniak BA. (2010): Pleomorphic and dedifferentiated leiomyosarcoma: clinicopathologic and immunohistochemical study of 41 cases. *Hum Pathol* 41, 663-671.

Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP (2008): Differential expression of S100 protein subtypes in malignant melanoma, and benign and malignant peripheral nerve sheath tumors. *J Cutan Pathol* 35, 1014-1019.

Nowak D, Popow-Woźniak A, Raźnikiewicz L, Malicka-Błaszkiwicz M (2009): Actin in the wound healing process. *Postepy Biochem* 55, 138-144.

Onganer PU, Seckl MJ, Djamgoz MB (2005): Neuronal characteristics of small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 93, 1197-1201.

Ozerhan IH, Ersoz N, Onguru O, Ozturk M, Kurt B, Cetiner S (2010): Fascin expression in colorectal carcinomas. *Clinics* 65, 157-164.

Paal E, Miettinen M (2001): Retroperitoneal leiomyomas: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 56 cases with a comparison to retroperitoneal leiomyosarcomas. *Am J Surg Pathol* 25, 1355-1363.

Pagani A, Papotti M, Abbona GC, Bussolati G (1995): Chromogranin gene expressions in colorectal adenocarcinomas. *Mod Pathol* 8, 626-632.

Palucka KA, Taquet N, Sanchez-Chapuis F, Gluckman JC (1998): Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* 160, 4587-4595.

Pape UF, Berndt U, Müller-Nordhorn J, Böhmig M, Roll S, Koch M, Willich SN, Wiedenmann B (2008a): Prognostic factors of long-term outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 15, 1083-1097.

Pape UF, Jann H, Müller-Nordhorn J, Bockelbrink A, Berndt U, Willich SN, Koch M, Röcken C, Rindi G, Wiedenmann B (2008b): Prognostic relevance of a novel TNM classification system for upper gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Cancer* 113, 256-265.

Pelosi G, Pasini F, Fraggetta F, Pastorino U, Iannucci A, Maisonneuve P, Arrighi G, De Manzoni G, Bresaola E, Viale G (2003): Independent value of fascin immunoreactivity for predicting lymph node metastases in typical and atypical pulmonary carcinoids. *Lung Cancer* 42, 203-313.

Petrides PE: Kapitel 37 Immunsystem; in: *Biochemie und Pathobiochemie*; hrsg. v. Löffler G, Petrides PE; Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1998, 1047-1086.

Pezzutto A, Behm F, Callard RE: Flow cytometry analysis of the B-cell blind panel: joint report; in: *Leukocyte Typing IV. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 4th International Workshop and Conference, Vienna, Austria (Feb. 21-25)*; hrsg. v. Knapp W, Dörken B, Gilks WR unter Mitarbeit namhafter Autoren; Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo 1989, 165-174.

Pinkus GS, Pinkus JL, Langhoff E, Matsumura F, Yamashiro S, Mosialos G, Said JW (1997): Fascin, a sensitive new marker for Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. Evidence for a dendritic or B cell derivation? *Am J Pathol* 150, 543-562.

Plöckinger U, Wiedenmann B (2007): Treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Virchows Arch* 451, 71-80.

Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J (2009): CD56 bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 126, 458-465.

Pollard TD, Cooper JA (2009): Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208-1212.

Preynat-Seauve O, Schuler P, Contassot E, Beermann F, Huard B, French LE (2006): Tumor-infiltrating dendritic cells are potent antigen-presenting cells able to activate T cells and mediate tumor rejection. *J Immunol* 176, 61-67.

Radzun HJ, Hansmann ML, Heidebrecht HJ, Bodewadt-Radzun S, Wacker HH, Kreipe H, Lumbeck H, Hernandez C, Kuhn C, Parwaresch MR (1991): Detection of a monocyte/macrophage differentiation antigen in routinely processed paraffin-embedded tissues by monoclonal antibody Ki-M1P. *Lab Invest* 65, 306-315.

Raes G, Beschin A, Ghassabeh GH, De Baetselier P (2007): Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Curr Opin Immunol* 19, 454-459.

Raju GC, Lee YS (1988): Gastrointestinal carcinoid tumours: histological, histochemical and immunohistochemical study. *Ann Acad Med Singapore* 17, 81-88.

Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, Valle J, Metrakos P, Smith D, Vinik A (2011): Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 364, 501-513.

Rindi G, de Herder WW, O'Toole D, Wiedenmann B (2006a): Consensus guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine tumors: why such guidelines and how we went about it. *Neuroendocrinology* 84, 155-157.

Rindi G, Klöppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, Eriksson B, Falchetti A, Falconi M, Komminoth P and all other Frascati Consensus Conference participants; European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) (2006b): TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 449, 395-401.

Rindi G, Klöppel G, Couvelard A, Komminoth P, Körner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY (2007): TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 451, 757-762.

Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma V (1997): Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol* 182, 318-324.

Rorstad O (2005): Prognostic indicators for carcinoid neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. *J Surg Oncol* 89, 151-160.

Ross R, Ross XL, Schwing J, Längin T, Reske-Kunz AB (1998): The actin-bundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 160, 3776-3782.

Ross HM, Daniel HDJ, Vivekanandan P, Kannangai R, Yeh MM, Wu TT, Makhlof HR, Torbenson M (2011): Fibrolamellar carcinomas are positive for CD68. *Mod Pathol* 24, 390-395.

Saito T, Yamazaki T: TC4. CD3 workshop panel report; in: Leukocyte typing VI. White cell differentiation antigens. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference, Kobe, Japan (Nov. 10-14); hrsg. v. Kishimoto T unter Mitarbeit namhafter Autoren; Garland Publishing Inc., New York, London 1996, 44-48.

Salcedo R, Ponce ML, Young HA, Wasserman K, Ward JM, Kleinman HK, Oppenheim JJ, Murphy WJ (2000): Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 96, 34-40.

Sandel MH, Dadabayev AR, Menon AG, Morreau H, Melief CJM, Offringa R, van der Burg SH, Janssen-van Rhijn CM, Ensink NG, Tollenaar RAEM, van deVelde CJH, Kuppen PJK (2005): Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin Cancer Res* 11, 2576-2582.

Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K (2005): Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 102, 18538-18543.

Schott M, Seissler J (2003): Dendritic cell vaccination: new hope for the treatment of metastasized endocrine malignancies. *Trends Endocrinol Metab* 14, 156-162.

Schott M, Seissler J, Feldkamp J, von Schilling C, Scherbaum WA (1999): Dendritic cell immunotherapy induces antitumor response in parathyroid carcinoma and neuroendocrine pancreas carcinoma. *Horm Metab Res.* 31, 662-664.

Sebastian M (2010): Review of catumaxomab in the treatment of malignant ascites.

Cancer Manag Res 8, 283-6.

Sfanos KS, Bruno TC, Meeker AK, De Marzo AM, Isaacs WB, Drake CG (2009): Human prostate infiltrating CD8+ T lymphocytes are oligoclonal and PD-1+. *Prostate* 69, 1694-1703.

Sica A, Allavena P, Mantovani A. (2008): Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett* 267, 204-215.

Sökmensüer C, Gedikoglu G, Uzunalimoglu B (2001): Importance of proliferation markers in gastrointestinal carcinoid tumors: a clinicopathologic study. *Hepatogastroenterology* 48, 720-723.

Soga J (2009): The term "carcinoid" is a misnomer: the evidence based on local invasion. *J Exp Clin Cancer Res* 28, 15.

Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P (2009): Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 86, 1-9.

Steinman RM, Hawiger D, Liu K, Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Iyoda T, Ravetch J, Dhodapkar M, Inaba K, Nussenzweig M (2003): Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 987, 15-25.

Stock N, Chibon F, Binh MB, Terrier P, Michels JJ, Valo I, Robin YM, Guillou L, Ranchère-Vince D, Decouvelaere AV, Collin F, Birtwisle-Peyrottes I, Gregoire F, Aurias A, Coindre JM (2009): Adult-type rhabdomyosarcoma: analysis of 57 cases with clinicopathologic description, identification of 3 morphologic patterns and prognosis. *Am J Surg Pathol* 33, 1850-1859.

Strosberg JR, Fine RL, Choi J, Nasir A, Coppola D, Chen DT, Helm J, Kvols L (2011): First-line chemotherapy with capecitabine and temozolomide in patients with metastatic pancreatic endocrine carcinomas. *Cancer* 117, 268-275.

Suzuki A, Masuda A, Nagata H, Kameoka S, Kikawada Y, Yamakawa M, Kasajima T (2002): Mature dendritic cells make clusters with T cells in the invasive margin of colorectal carcinoma. *J Pathol* 196, 37-43.

Svagzdys S, Lesauskaite V, Pavalkis D, Nedzelskiene I, Pranys D, Tamelis A (2009): Microvessel density as new prognostic marker after radiotherapy in rectal cancer. *BMC Cancer* 9, 95.

Swann JB, Smyth MJ (2007): Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 117, 1137-1146.

Tanaka S, Green SR, Quehenberger O (2001): Differential expression of the isoforms for the monocyte chemoattractant protein-1 receptor, CCR2, in monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 73-80.

Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (2003): The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med* 348, 1134-1149.

Terraube V, Pendu R, Baruch D, Gebbink MF, Meyer D, Lenting PJ, Denis CV (2006): Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factor-deficient mice. *J Thromb Haemost* 4, 519-526.

Van de Broek I, Leleu X, Schots R, Facon T, Vanderkerken K, Van Camp B, Van Riet I (2006): Clinical significance of chemokine receptor (CCR1, CCR2 and CXCR4) expression in human myeloma cells: the association with disease activity and survival. *Haematologica* 91, 200-206.

Vermi W, Bonecchi R, Facchetti F, Bianchi D, Sozzani S, Festa S, Berenzi A, Cella M, Colonna M (2003): Recruitment of immature plasmacytoid dendritic cells (plasmacytoid monocytes) and myeloid dendritic cells in primary cutaneous melanomas. *J Pathol* 200, 255-268.

Vikman S, Giandomenico V, Sommaggio R, Oberg K, Essand M, Tötterman TH (2008): CD8+ T cells against multiple tumor-associated antigens in peripheral blood of midgut carcinoid patients. *Cancer Immunol Immunother* 57, 399-409.

Vikman S, Sommaggio R, De La Torre M, Oberg K, Essand M, Giandomenico V, Loskog A, Totterman TH (2009): Midgut carcinoid patients display increased numbers of regulatory T cells in peripheral blood with infiltration into tumor tissue. *Acta Oncol* 48, 391-400.

Vinik AI, Silva MP, Woltering EA, Go VL, Warner R, Caplin M (2009): Biochemical testing for neuroendocrine tumors. *Pancreas* 38, 876-889.

Whiteside TL (2008): The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene* 27, 5904-5912.

Wilander E, Grimelius L (1993): Identification, characterization and classification of endocrine tumours. *Zentralbl Pathol* 139, 95-100.

Witz IP. (2008): Yin-yang activities and vicious cycles in the tumor microenvironment. *Cancer Res* 68, 9-13.

Won KY, Kim GY, Lim SJ, Park YK, Kim YW (2009): Prognostic significance of fascin expression in extrahepatic bile duct carcinomas. *Pathol Res Pract* 205, 742-748.

Xie ZJ, Li-Min Jia, Ye-Chun He, Jiang-Tao Gao (2006): Morphological observation of tumor infiltrating immunocytes in human rectal cancer. *World J Gastroenterol* 12, 1757-1760.

Yamashiro S, Yamakita Y, Ono S, Matsumura F (1998): Fascin, an actin-bundling protein, induces membrane protrusions and increases cell motility of epithelial cells. *Mol Biol Cell* 9, 993-1006.

Yamazaki S, Dudziak D, Heidkamp GF, Fiorese C, Bonito AJ, Inaba K, Nussenzweig MC, Steinman RM (2008): CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 181, 6923-33.

Yao JC, Lombard-Bohas C, Baudlin E, Kvols LK, Rougier P, Ruzniewski P, Hoosen S, St. Peter J, Haas T, Lebwohl D (2010): Daily oral everolimus activity in patients with metastatic pancreatic neuroendocrine tumors after failure of cytotoxic chemotherapy: a phase II trial. *J Clin Oncol* 28, 69-76.

Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG (2011): Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 364, 514-523.

Zhang FR, Tao LH, Shen ZY, Lv Z, Xu LY, Li EM (2008): Fascin expression in human embryonic, fetal, and normal adult tissue. *J Histochem Cytochem* 56, 193-199.

Zhuang X, Xia X, Wang C, Gao F, Shan N, Zhang L (2010): A high number of CD8+ T cells infiltrated in NSCLC tissues is associated with a favorable prognosis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 18, 24-28.

Lebenslauf

Am 15. März 1985 wurde ich in Oldenburg geboren. Mein Vater ist Arzt, meine Mutter ist Lehrerin. Ich habe eine jüngere Schwester und einen jüngeren Bruder.

Meine ersten Grundschuljahre, 1991-1995, verbrachte ich in Nordenham an der GrundschuleSüd. Von 1995-1997 besuchte ich die Orientierungsstufe und ab 1997 das Gymnasium in Nordenham. In der Oberstufe belegte ich die Prüfungsfächer Englisch, Biologie, Politik und Latein. Im Juni 2004 erlangte ich die allgemeine Hochschulreife mit der Note 1,3.

Von Juli 2004 bis zum September 2004 absolvierte ich ein Krankenpflegepraktikum in der Wesermarschlinik in Nordenham.

Von September 2004 bis zum Mai 2005 leistete ich meinen Zivildienst in der Arbeiterwohlfahrt in Brake, Unterweser ab. Dort war ich hauptsächlich in der Abteilung „Essen auf Rädern“ beschäftigt.

Im Oktober 2005 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Im September 2007 schloss ich den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note -sehr gut- (1,5) ab. Während des klinischen Abschnitts meines Studiums famulierte ich in der Gastroenterologie, Hämatologie/Onkologie, Neurologie, Pathologie und Dermatologie. Ich begann meine Promotionsarbeit in der Abteilung Gastroenterologie-Endokrinologie am Zentrum Innere Medizin in der Universitätsmedizin Göttingen mit dem Titel „Tumormikroenvironment in Neuroendokrinen Tumoren (NET) des gastroenteropankreatischen Systems“ unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Dr. Giuliano Ramadori und Frau Dr. Silke Cameron. Neben dem Studium arbeitete ich als studentische Hilfskraft in der Abteilung Klinische Chemie in der Universitätsmedizin Göttingen.

Mein praktisches Jahr begann ich im August 2010 und beendete es im Juli 2011. Mein erstes Tertial verbrachte ich am Pius-Hospital und am Evangelischen Krankenhaus in Oldenburg. Ich rotierte durch die Abteilungen für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Unfallchirurgie, Gefäßchirurgie, Plastische und Handchirurgie. Mein zweites Tertial absolvierte ich im Klinikum Bremerhaven Reinkenheide in der Klinik für Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie. Mein drittes Tertial verbrachte ich in der Inneren Medizin im Universitätsspital Basel.

Im Dezember 2011 schloss ich den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note –sehr gut- (1,5) ab. Damit beendete ich das Humanmedizinstudium an der Universität Göttingen mit der Gesamtnote –sehr gut- (1,5). Im April 2012 nahm ich eine Tätigkeit als Assistenzarzt in der Klinik für Thorax-, Gefäß-, und endovaskuläre Chirurgie am Pius-Hospital in Oldenburg auf. Im November 2012 wurde Herr Prof. Dr. Tilman Sauerbruch mein neuer Promotionsvater. Frau Dr. Silke Cameron betreute meine Dissertation den gesamten Zeitraum.

Oldenburg, den 12.12.2012

Danksagung

Es gibt einige Menschen, denen ich meinen Dank aussprechen möchte, da meine Dissertationsarbeit ohne sie nicht möglich gewesen wäre. Zunächst möchte ich meinem Promotionsvater Herrn Prof. Sauerbruch dafür danken, dass er die Betreuung meiner Arbeit ohne zu zögern so kurzfristig übernommen hat und die Abgabe der Arbeit dadurch enorm voran getrieben hat. Darüber hinaus geht ein ganz besonderer Dank an Frau Dr. Silke Cameron. Ich danke ihr sehr dafür, dass sie mich über einen so langen Zeitraum mit großer Beharrlichkeit unterstützt hat, und auch zu den unmöglichsten Zeiten mit ihrer besonnenen Art immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte. Ich danke Herrn Prof. Ramadori, der wertvolle Anregungen für meine Arbeit gab. Ich danke Herrn Prof. Füzesi für seine Kooperation, und dass er mir die Möglichkeit einräumte, zu jeder Zeit mit den pathologischen Präparaten arbeiten zu können. Ich danke meinen Eltern, ohne die ein Medizinstudium und eine Promotion nicht möglich sind, und die mich moralisch immer unterstützt haben. Ich danke den Mitarbeitern im Labor und in der Pathologie für ihre tatkräftige Unterstützung. Ein Dank geht an meine Freunde aus Göttingen, die mir während des Studiums und der Promotionsarbeit, auch in schwierigen Phasen, zur Seite standen, wenn ich sie brauchte.

Oldenburg, den 12.12.2012