Aus dem
Institut für Pathologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Frau Univ.-Prof. Dr. med. Irene Esposito

Pathologie und Genetik großzelliger neuroendokriner Karzinome des Kolons und Rektums

Dissertation

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

vorgelegt von

Inga Boeck

2020

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

gez.:
Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöckner
Erstgutachter: Prof. Dr. med. Martin Anlauf
Zweitgutachter: PD Dr. med. Torsten Feldt

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Krieg, A., Mersch, S., Boeck, I., Dizdar, L., Weihe, E., Hilal, Z., Krausch, M., Möhlendick, B., Topp, SA., Piekorz, RP., Huckenbeck, W., Stoecklein, NH., Anlauf, M., Knoefel, WT. New model for gastroenteropancreatic large-cell neuroendocrine carcinoma: establishment of two clinically relevant cell lines. PLoS One. 2014 Feb. 14; 9(2).

Zusammenfassung

Neuroendokrine Karzinome (NEC) des Kolons/ Rektums sind aggressive und seltene Tumoren. Mit der WHO-Klassifikation 2010 wurde erstmals die Entität der großzelligen neuroendokrinen Karzinome (LCNEC) von den kleinzelligen neuroendokrinen Karzinomen (SCNEC) abgegrenzt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist eine umfassende pathologische Charakterisierung dieser Tumoren.

Über einen Zeitraum von vier Jahren wurden an zwei Tumorzentren 455 Patienten mit kolorektalem Karzinom (KRK) operiert. Diese wurden retrospektiv immunhistochemisch auf das Vorhandensein spezifischer neuroendokriner Marker gescreent und drei in der WHO definierten Subgruppen gering differenzierter NEN zugeordnet (LCNEC, SCNEC, gemischt adenoneuroendokrine Karzinome (MANEC)). Diese wurden mit 16 immunhistochemischen Markern charakterisiert und molekularpathologisch auf therapeutisch/ prognostisch relevante Aberrationen hin untersucht. Zwei LCNEC-Zelllinien wurden etabliert und immunhistochemisch charakterisiert.

Von den 455 KRK exprimierten 6,4 % (n=29) spezifische neuroendokrine Marker. Davon ließen sich 2,6 % LCNEC (n=12), 0,9 % SCNEC (n=4) und 0,7 % MANEC (n=3) zuordnen. Zusätzlich kristallisierte sich eine vierte Subgruppe der cribriformen adendoneuroendokrinen Karzinome (CCANE) heraus (n=9, 2,2 %). LCNEC und MANEC traten überwiegend rechtskolisch auf (83 % bzw. 67 %), wohingegen SCNEC und CCANE linkskolisch lokalisiert waren. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose lag oft ein UICC-Stadium IV vor (50 % LCNEC, 33 % MANEC, 75 % SCNEC, 56 % CCANE). Alle LCNEC exprimierten kräftig und homogen Synaptophysin, Pan-Zytokeratin und CK8/18. p53 wurde in 75 % (n=9), CDX2 wird in >80 % (n=10) exprimiert. Keine NEN-Subgruppe zeigte eine Expression von HER2/neu, c-Kit, SSTR2A oder SSTR5. Sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Ebene der Proteinexpression war die aus dem kolorektalen LCNEC etablierte Zellkulturlinie (NEC-DUE2) mit diesen Befunden kongruent. Molekularpathologisch wiesen 58 % der LCNEC (n=7) eine V600E-BRAF-Mutation auf und 17 % (n=2) eine KRAS-Mutation in Codon 12 oder 13. C-Kit-Mutationen in den Exonen 9 und 11 oder EGFR-Mutationen in den Exonen 18, 19 oder 21 wurden nicht detektiert.

LCNEC treten häufiger auf als angenommen und zeigen im Vergleich zu konventionellen Adenokarzinomen häufiger V600E-BRAF-Mutationen. Inwiefern daraus therapeutische Implikationen erwachsen, müssen weitere Studien zeigen.

Summary

Neuroendocrine carcinomas (NEC) of the colon and rectum are aggressive and rare tumors. The WHO classification 2010 defines the entity of large cell NEC (LCNEC) and small cell NEC (SCNEC). This study provides a meticulous characterization of LCNEC regarding clinico-pathological aspects.

Over a period of four years 455 patients with colorectal cancer have been undergone surgery in two huge tumor centers. After immunhistochemical staining with specific neuroendocrine markers they have been subdivided in three subgroups of high grade neuroendocrine neoplasms (high grade NEN): LCNEC, SCNEC and mixed adenoneuroendocrine carcinomas (MANEC). These were further characterized by 16 immunohistochemical stains and molecular markers with therapeutic and prognostic relevance. Two cell lines were established from LCNEC and extensively analyzed regarding expression of neuroendocrine markers.

Using immunohistochemistry 6,4% (n=29) expressed specific neuroendocrine markers. These could be subdivided in LCNEC (2,6 %, n=12), SCNEC (0,9 %, n=4) and MANEC (0,7%, n=3). Furthermore, a fourth subgroup named cribriform adenoneuroendocrine carcinomas (CCANE, 2,2 %, n=9) was identified. LCNEC and MANEC occurred predominately in the right colon (83% and 67% respectively) whereas SCNEC and CCANE were located in the left colon. At the time of diagnosis patients presented with UICC stage IV (50% LCNEC, 33% MANEC, 75% SCNEC, 56% CCANE). All LCNEC strongly and homogeneously expressed synaptophysin, pan-cytokeratine and CK8/18. P53 was expressed in 75% (n=9) and CDX2 in >80% (n=10). None of the NEN subgroups stained for HER2/neu, c-Kit, SSTR2A or SSTR5. On a basis of RNA-level and protein expression the established cell line from colorectal LCNEC (NEC-DUE2) was maintaining these findings. 58% of LCNEC (n=7) harbored a V600E-BRAF-mutation and 17% (n=2) a KRAS-mutation (codon 12/ 13). C-Kit- or EGFR-mutations were detected in none of the tumors.

LCNEC occur more often than appreciated in the past and frequently harbor V600E-BRAF mutations. Further studies are needed to define therapeutic implications.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung I
Summary II
Inhaltsverzeichnis III
Abbildungen V
Tabellen VI
Abkürzungsverzeichnis VII
1 Einleitung 1
1.1 Kolorektales Karzinom 1
1.1.1 Epidemiologie 1
1.1.2 Histologische Subtypen 1
1.2 Neuroendokrine Neoplasien des Dickdarms 2
1.2.1 Histogenese und allgemeine Marker 2
1.2.2 Klassifikation und Nomenklatur 2
1.3 Neuroendokrine Karzinome des Dickdarms 4
1.3.1 Definition und Epidemiologie 4
1.3.2 Histopathologie 5
1.3.3 Klinische Diagnostik 6
1.3.4 Prognose 7
1.3.5 Molekularpathologie 8
1.3.6 Therapeutische Strategien 11
1.4 Zielsetzung und Fragestellungen 11
2 Material 13
2.1 Geräte 13
2.2 Verbrauchsmaterialien 14
2.3 Chemikalien 14
2.4 Kits 15
3 Methoden 16
3.1 Klinische Pathologie 16
3.2 Gewebeaufarbeitung 16
3.3 Immunhistochemie 17
3.4 Molekularpathologische Untersuchungen 18
3.4.1 DNA-Isolierung aus Paraffingewebe 18
3.4.2 DNA-Messung 19

3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion 19
3.4.4 Elektrophorese von PCR-Produkten 21
3.4.5 Aufreinigung der DNA und Sequenzierung nach Sanger 22
3.5 Untersuchungen an der Zellkultur 23
3.5.1 Etablierung der Zellkultur 23
3.5.2 Immunhistochemie 23
3.5.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie 23
3.5.3 Elektronenmikroskopie 24
4 Ergebnisse 26
4.1 Frequenz primärer NEC 26
4.2 Epidemiologie und klinische Pathologie von NEC 30
4.2.1 Patientenalter und Geschlecht 30
4.2.2 Tumorlokalisation 30
4.2.3 Tumorstadium der neuroendokrinen Karzinome 31
4.2.4 Histopathologie 31
4.3 Hereditärer Hintergrund und funktionelle Aktivität 35
4.4 Immunhistochemische und molekularpathologische Analyse von NEC 36
4.5 Etablierung und Charakterisierung von zwei NEC-Zelllinien 40
5 Diskussion 44
5.1 Frequenz primärer NEC 44
5.2 Epidemiologie und klinische Pathologie von NEC 45
5.2.1 Patientenalter und Geschlecht 45
5.2.2 Tumorlokalisation 45
5.2.3 Tumorstadium 46
5.2.4 Histologische Charakteristika 47
5.3 Hereditärer Hintergrund und funktionelle Aktivität 47
5.4 Immunhistochemische und molekularpathologische Analyse von NEC 49
5.4.1 Immunhistochemie 49
5.4.2 Molekularpathologische Targets 53
5.5 Etablierung und Charakterisierung von zwei NEC Zelllinien 59
5.6 Ausblick 61
Literaturverzeichnis 63
Danksagung 86

Abbildungen

Abb. 1: Histomorphologie neuroendokriner Karzinome (H&E, 200x) 5
Abb. 2: Verteilung der Tumorentitäten in 455 Operationspräparaten..... 27
Abb. 3: Verschiedene Wachstumsmuster großzelliger neuroendokriner Karzinome (H&E, 100x) 33
Abb. 4: Zytologie von großzelligen und kleinzelligen neuroendokrinen Karzinomen (H&E, 400x) 34
Abb. 5: Neuroendokrine Neoplasien mit Expression der spezifischen neuroendokrinen Marker Synaptophysin und Chromogranin A (200 x) 35
Abb. 6: Elektronenmikroskopie der LCNEC Zelllinie NEC-DUE2 41
Abb. 7: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie der Zelllinie NEC-DUE2 42
Abb. 8: Immunhistochemische Charakterisierung der Zellinie NEC-DUE2 (400x) 43
Abb. 9: Nachweis von Transkripten mittels RT-PCR (aus Krieg et al., 2014)..... 60

Tabellen

Tabelle 1: Proliferationsbasiertes Grading von neuroendokrinen Neoplasien des Gastrointestinaltrakts und des Pankreas 3

Tabelle 2: Untersuchte molekulare Zielstrukturen und ihre Bedeutung 9

Tabelle 3: Geräte 13

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien 14

Tabelle 5: Chemikalien 14

Tabelle 6: Kits 15

Tabelle 7: Primäre Antikörper Immunhistochemie 18

Tabelle 8: Primersequenzen für Polymerase-Kettenreaktion 20

Tabelle 9: Primäre Antikörper für konfokale Laser Scanning Mikroskopie 24

Tabelle 10: Verwendete Fluorochrome für die konfokale Laser Scanning Mikroskopie 24

Tabelle 11: Anzahl der Diagnosen neuroendokriner Neoplasien im Untersuchungszeitraum ... 26

Tabelle 12: Epidemiologie, Lokalisation und Therapie von Patienten mit neuroendokrinen Neoplasien des Dickdarms 28

Tabelle 13: TNM-Klassifikation und Tumorstadium von Patienten mit neuroendokrinen Neoplasien des Dickdarms 29

Tabelle 14: Patientenalter bei Operation einer neuroendokrinen Neoplasie 30

Tabelle 15: Geschlechtsverteilung neuroendokriner Neoplasien 30

Tabelle 16: Lokalisation neuroendokriner Neoplasien 31

Tabelle 17: Tumorstadien neuroendokriner Neoplasien 31

Tabelle 18: Immunhistochemisches Markerprofil von neuroendokrinen Neoplasien des Dickdarms (Neuroendokrine Marker, Somatostatin-Rezeptoren, Proliferation) 37

Tabelle 19: Immunhistochemisches Markerprofil von neuroendokrinen Neoplasien des Dickdarms (epitheliale Marker und Transkriptionsfaktoren) 38

Tabelle 20: Auswertung therapeutisch und prognostisch relevanter molekularer Marker 39

Tabelle 21: Literatur zu Zelllinien neuroendokriner Neoplasien 62

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter, 10^{-6} l
µm	Mikrometer, 10^{-6} m
µmol	Mikromol, 10^{-6} mol
AC	Adenokarzinom (*adenocarcinoma*)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BRAF	Murines Sarkomvirus Onkogen Homolog B1
CD	*Cluster of differentiation*
CDX2	Homeobox Transkriptionsfaktor 2 vom kaudalen Typ *(Caudal type homeobox 2)*
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CgA	Chromogranin A
CK	Zytokeratin (*cytokeratine*)
c-Kit	Kit Protoonkogen Rezeptor-Tyrosinkinase
CTP	Cytidintriphosphat
DAB	Diaminobenzidin
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure *(Deoxyribonucleic acid)*
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	Doppelstrang
ECL	Enterochromaffinartig *(enterochromaffin like)*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor *(Epidermal growth factor receptor)*
ENETS	Europäische Gesellschaft für neuroendokrine Tumoren *(European Neuroendocrine Tumour Society)*
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fetales Rinderserum *(Fetal calve serum)*
FDG-PET	Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie
GEP	Gastroenteropankreatisch
GTP	Guanosintriphosphat

H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
H&E	Hämatoxylin-Eosin
Her2/neu	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolorektales Karzinom *(hereditary non-polyposis colorectal cancer)*
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase)
KRAS	Kirsten Ratten Sarkomvirus Onkogen Homolog
KRK	Kolorektales Karzinom
LCNEC	Großzelliges neuroendokrines Karzinom *(large cell neuroendocrine carcinoma)*
mA	Milliampere
MANEC	Gemischt adenoneuroendokrines Karzinom *(mixed adenoneuroendocrine carcinoma*)
MEN	Multiple neuroendokrine Neoplasie
Min	Minuten
MiNEN	Gemischt neuroendokrin-nicht-neuroendokrine Neoplasie *(mixed neuroendocrine-nonneuroendocrine neoplasm)*
MLH1	MutL Homolog 1
MMR	DNA-Reparatur (*mismatch-repair*)
MSH	MutS Homolog (2 und 6)
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MSS	Mikrosatelliten-stabil
NaOH	Natriumhydroxid
NEC	Neuroendokrines Karzinom *(neuroendocrine carcinoma*)
NEN	Neuroendokrine Neoplasie
NET	Neuroendokriner Tumor
nm	Nanometer, 10^{-9} m
NSE	Neuron-spezifische Enolase
NTP	Nukleosidtriphosphat
p53	Tumorprotein p53
PAS	*Periodic acid Schiff*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)

PDNEC	Gering differenzierte neuroendokrine Karzinome (*poorly differentiated neuroendocrine carcinoma*)
PMS2	PMS 1 Homolog 2
PRRT	Peptid-Rezeptor-Radionukleotid-Therapie
RNA	Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid)*
rpm	Umdrehungen pro Minute *(revolutions per minute)*
RPMI	Zellkulturmedium entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
SCLC	Kleinzelliges Bronchialkarzinom *(small cell lung cancer)*
SCNEC	Kleinzelliges neuroendokrines Karzinome *(small cell neuroendocrine carcinoma)*
sec	Sekunden
SEER	Programm zur Überwachung, Epidemiologie und Endergebnissen; amerikanisches Krebsregister *(survaillance, epidemiology and end results program)*
SSTR	Somatostatinrezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE	TRIS/EDTA
TNM	Tumor, Nodus, Metastasen, Tumorklassifikation
TRIS	Trishydroxymethyl-aminomethan
TTF	Thyroidaler Transkriptionsfaktor
TTP	Thymidintriphosphat
UICC	Internationale Vereinigung gegen Krebs *(Union international contre le cancer)*
UK	Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland *(United Kingdom)*
USA	Vereinigte Staaten von Amerika *(United States of Amercia)*
UV	Ultraviolette Strahlung
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
WHO	Weltgesundheitsorganisation *(World health organization)*

1 Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom (KRK) ist mit über 73.000 Neuerkrankungen und ca. 27.000 Todesfällen pro Jahr in Deutschland einer der häufigsten malignen Tumoren (Vogl et al., 2013) und ist die dritthäufigste Krebserkrankung in den westlichen Industrienationen (Szylberg et al., 2015). Das Erkrankungsrisiko steigt bis ins hohe Alter stetig an, die Lebenszeitinzidenz beträgt 6 %, wobei Männer etwas häufiger als Frauen betroffen sind (Vogl et al. 2013). Bei Frauen beträgt das mittlere Erkrankungsalter 75, bei Männern 72 Jahre (Robert Koch-Institut, 2017).

1.1.2 Histologische Subtypen

KRK sind heterogene Tumoren. Das unterschiedliche Outcome und das Therapieansprechen kann zumindest zum Teil mit verschiedenen histologischen und molekularen Subtypen erklärt werden (Nagtegaal und Hugen, 2015). Unterschiedliche histologische Subtypen unterscheiden sich in ihrem molekularen Tumorphänotyp ebenso wie in ihrer komplexen tumorassoziierten zellulären Umgebung (*microenvironment*) (Nagtegaal und Hugen, 2015).

Mehrere Subtypen des Dickdarmkarzinoms sind seit Längerem bekannt und zum Teil gut untersucht, da sie sich phänotypisch deutlich vom konventionellen Adenokarzinom (AC) unterscheiden (Carneiro F et al. (Hrsg.), 2010) (Wick et al. 2005). Ein Musterbeispiel ist hier das muzinöse Adenokarzinom. Seltenere Subtypen sind das siegelringzellige Karzinom, das adenosquamöse Karzinom und das neuroendokrine Karzinom (NEC). Letztere werden in klein- und großzellige NEC unterteilt und sind gekennzeichnet durch eine spezifische Morphologie und den immunhistochemischen Nachweis spezifischer neuroendokriner Marker (Carneiro F et al. (Hrsg.), 2010) (Wick et al. 2005). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat seit 2010 zudem drei weitere Subtypen insbesondere auf Basis molekularer und genetischer Studien abgegrenzt (Carneiro F et al. (Hrsg.), 2010): Das medulläre Dickdarmkarzinom, welches stark mit einer Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und dem Lynch-Syndrom assoziiert ist. Das serratierte Dickdarmkarzinom, welches über den sog. serratierten Signalweg entsteht

und sich aus sessilen serratierten Adenomen, traditionellen serratierten Adenomen und gemischt adenomatös-serratierten Polypen ableitet. Zuletzt wurde zusätzlich der mikropapilläre Subtyp mit einer besonders schlechten Prognose definiert (Carneiro F et al. (Hrsg.), 2010).

1.2 Neuroendokrine Neoplasien des Dickdarms

1.2.1 Histogenese und allgemeine Marker

Neuroendokrine Neoplasien (NEN) sind epithelialen oder neuroektodermalen Ursprungs und definieren sich über die Präsenz neurosekretorischer Vesikel. Diese können elektronenmikroskopisch oder immunhistochemisch durch die Expression von Markerproteinen neuraler Zellen nachgewiesen werden, hier ist die Expression der neurosekretorischen Vesikelproteine Synaptophysin und Chromogranin A (CgA) (Carneiro F et al. (Hrsg.), 2010) (Klöppel, 2017) (Garcia-Carbonero et al., 2016) diagnostisch führend. Es handelt sich bei den neurosekretorischen Vesikeln entweder um *large dense core* Vesikel mit komplexiertem CgA oder um Synaptophysin-haltige *small presynaptic-like* Vesikel (Klöppel, 2017) (Estevez-Herrera et al., 2013) (Wiedenmann, 1991).

Hochdifferenzierte NEN (= Neuroendokrine Tumoren, NET) leiten sich von Zellen des disseminierten neuroendokrinen Systems ab. Diese sind definiert durch die Produktion, Speicherung und stimulusabhängige Sekretion von Hormonen und/ oder biogenen Aminen (Hiddemann (Hrsg.) 2010) (Carneiro F et al. (Hrsg.), 2010).

Vesikuläre Monoamintransporter 1 und 2 (VMAT1 und VMAT2) sind verantwortlich für den vesikulären Transport u. a. von Dopamin, Serotonin und Histamin (Anlauf et al., 2003) (Uccella et al., 2006). Klassischerweise wird VMAT1 in NET des Ileums und VMAT2 in gastrischen NET der enterochromaffinartigen (ECL-) Zellen exprimiert (Jakobsen et al., 2001). Aber auch NEN anderer Lokalisation werden mit anti-VMAT Antikörpern angefärbt, sodass sie als generelle neuroendokrine Marker gelten (Uccella et al., 2006).

1.2.2 Klassifikation und Nomenklatur

Unter dem Begriff der gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Neoplasien (GEP-NEN) wird die Gesamtheit aller gut differenzierten NEN (NET) und schlecht differenzierten NEN (Neuroendokrine Karzinome, NEC) in Verdauungstrakt und

Pankreas subsumiert. Dies geschieht in Abhängigkeit von dem morphologischen Differenzierungsgrad (Carneiro F et al. (Hrsg.), 2010) (Tabelle 1). Gemäß der aktuellen WHO Klassifikation des Verdauungstraktes 2010 und des Pankreas 2017, hat jede NEN ein malignes Potenzial. Die Wahrscheinlichkeit zu metastasieren unterscheidet sich jedoch beträchtlich zwischen unterschiedlichen Entitäten bezogen auf Differenzierung, Proliferation, Tumorgröße, endokrinologischer Aktivität und Lokalisation (Carneiro F et al. (Hrsg.), 2010) (Lloyd et al. (Hrsg.), 2017).

NET werden auf Basis des proliferationsbasierten Gradings in NET G1 (<2 %) und NET G2 (2-20 %) unterteilt (Rindi et al., 2007) (Tabelle 1). In Bezug auf das Pankreas wurde die WHO-Klassifikation revidiert, hier wurde zusätzlich die Kategorie des NET G3 eingeführt (Klöppel, 2017), welches durch eine hochdifferenzierte Morphologie bei gleichzeitigem Ki-67-Proliferationsindex von >20 % gekennzeichnet ist (Tabelle 1).

Tabelle 1: Proliferationsbasiertes Grading von neuroendokrinen Neoplasien des Gastrointestinaltrakts und des Pankreas

Grading GEP-NEN WHO-Klassifikation 2010	Ki67-Index		Grading PanNEN WHO-Klassifikation 2017
Hochdifferenzierte NET			Hochdifferenzierte PanNET
NET G1 / Karzinoid	<2%	<3%	PanNET G1
NET G2	2-20%	3-20%	PanNET G2
		>20%	PanNET G3
Niedrigdifferenzierte NEC (G3)	>20%	>20%	Niedrigdifferenzierte PanNEC (G3)
Kleinzellig			Kleinzellig
Großzellig			Großzellig
Gemischt adenoneuroendokrines Karzinom (MANEC)	Jeder Wert möglich		Gemischt neuroendokrin-nicht-neuroendokrine Neoplasie (MiNEN)

GEP-NEN Neuroendokrine Neoplasien des gastroenteropankreatischen Systems, **HPF** high power field, **MANEC** gemischt adenoneuroendokrines Karzinom, **MiNEN** gemischt neuroendokrin-nicht-neuroendokrine Neoplasie, **NEC** neuroendokrines Karzinom, **NET** neuroendokriner Tumor, **PanNEC** pankreatisches neuroendokrines Karzinom, **PanNET** pankreatischer neuroendokriner Tumor, **WHO** Weltgesundheitsorganisation.

Die NEC untergliedern sich in kleinzellige neuroendokrine Karzinome (SCNEC) und großzellige neuroendokrine Karzinome (LCNEC). Per definitionem weisen alle NEC einen Proliferationsindex von >20 % auf und sind somit Grad 3.

Die Kategorie der adenoneuroendokrinen Karzinome (MANEC) wurde erstmals 2010 in die WHO-Klassifikation aufgenommen und beschreibt gemischte Tumoren, in denen sowohl die neuroendokrin differenzierte als auch die nicht-neuroendokrin differenzierte Komponente jeweils mindestens 30 % ausmachen muss (Carneiro F et al. (Hrsg.),

2010). In der aktuell erschienenen Klassifikation des endokrinen Pankreas werden diese gemischten Neoplasien als gemischt neuroendokrin-nicht-neuroendokrine Neoplasien (MiNEN) adressiert, um der Tatsache Ausdruck zu verleihen, dass die Kombinationspartner hochgradig variabel sind (z. B. NEC/ Plattenepithelkarzinom, NEC/ Adenom) (Lloyd et al. (Hrsg.), 2017).

1.3 Neuroendokrine Karzinome des Dickdarms

1.3.1 Definition und Epidemiologie

Der Gastrointestinaltrakt ist nach der Lunge der zweithäufigste Manifestationsort für NEC und macht etwa 35–55 % aller extrapulmonalen NEC aus (Strosberg et al., 2010) (Walenkamp et al., 2009) (Lee et al., 2007). Sie sind vor allem im Ösophagus, Pankreas, Ampulla Vateri und Kolon lokalisiert (Sorbye et al., 2014) (Brenner et al., 2004) (Sorbye et al., 2013). NEC können somit annähernd im gesamten Gastrointestinaltrakt auftreten. SCNEC entstehen insbesondere in den Abschnitten des Verdauungstraktes, die plattenepithelial ausgekleidet sind (Ösophagus, Anus) (Shia et al., 2008) (Carneiro F et al. (Hrsg.), 2010).

Es ist nicht gesichert, wie viel Prozent der Kolonkarzinome NEC sind. In der Literatur wird ihre Häufigkeit basierend auf relativ kleinen Fallserien mit 1–2 % angenommen (Kang et al., 2007) (Staren et al., 1988). In zwei retrospektiven Studien mit 38 Patienten (Bernick et al., 2004) bzw. 126 Patienten (Smith et al., 2014) machen kolorektale NEC <1 % der kolorektalen Malignome aus. Zum Teil wird in den Arbeiten nicht zwischen LCNEC, SCNEC und MANEC unterschieden (Ilett et al., 2015). Die fehlende Konformität zur aktuellen Terminologie und die unpräzise Beschreibung der Tumorhistologie sowie der Proliferationsrate sind die Schwachstellen der insgesamt spärlich vorliegenden Studien.

Aufgrund der erst seit 2010 durch die WHO definierten Tumorentität und der differenzialdiagnostischen Schwierigkeiten liegt die Prävalenz von LCNEC des Dickdarms möglicherweise deutlich höher als bislang vermutet. Die Anzahl der Diagnosen von GEP-NEC scheint insgesamt stark anzusteigen (Scherübl et al., 2013) (Sorbye et al., 2013). Dies ist vermutlich auf die präzisere und standardisierte pathologische Klassifikation der überarbeiteten WHO-Klassifikation von 2010 zurückzuführen.

Bezüglich der Tumorlokalisation ergeben sich widersprüchliche Daten: In der WHO Klassifikation wird ihre Lokalisation überwiegend rechtskolisch angegeben (Carneiro F et al. (Hrsg.), 2010). Eine neuere Arbeit, die 49 NEC des Kolorektums untersuchte, fand jedoch eine Hauptlokalisation aboral der linken Flexur (Zhang et al., 2016). Problematisch bleibt erneut die Terminologie, die sich nicht an den Kriterien der WHO 2010 orientiert und Begrifflichkeiten wie „hochdifferenziertes NEC“, „intermediäres NEC“ und „kleinzelliges NEC“ benutzt.

1.3.2 Histopathologie

Wie die pulmonalen NEC werden GEP-NEC in großzellige NEC (LCNEC) und kleinzellige NEC (SCNEC) untergliedert (La Rosa et al., 2012) (Carneiro F et al. (Hrsg.), 2010).

SCNEC bestehen aus kleinen bis mittelgroßen (2-4 Lymphozytendurchmesser), runden bis ovalen Zellen mit nackten Zellkernen, Hyperchromasie und kaum sichtbaren Nukleolen (Abb.1). Der Proliferationsindex liegt bei deutlich >50 % und erreicht häufig bis zu 100 % (Carneiro F et al. (Hrsg.), 2010).

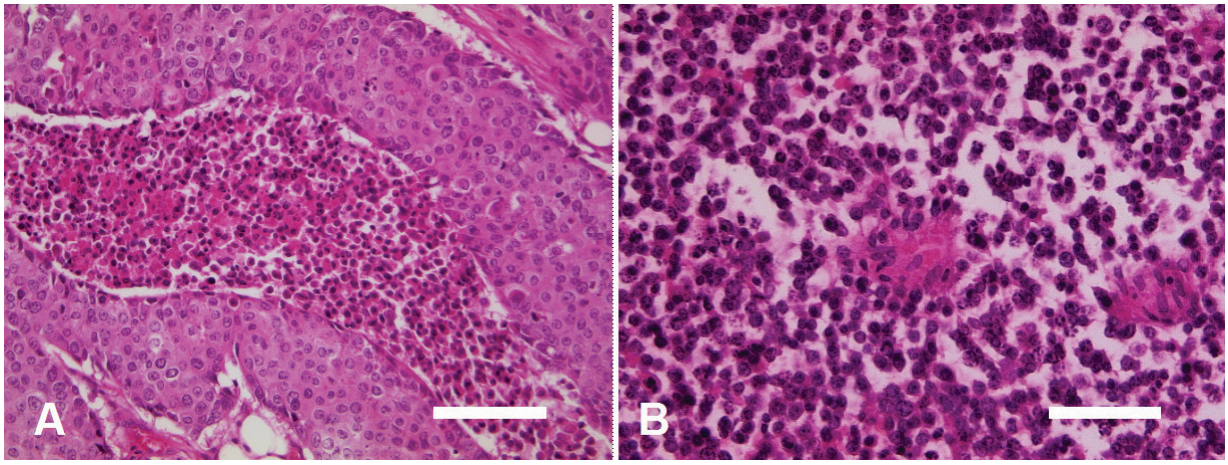


Abb. 1: Histomorphologie neuroendokriner Karzinome (H&E, 200x)

Großzellige neuroendokrine Karzinome (A) zeigen ein solides kohäsives Tumorwachstum mit Komedonekrosen, reichlich eosinophilem Zytoplasma und grobscholligem Chromatin mit gut sichtbaren Nukleolen. Kleinzellige neuroendokrine Karzinome (B) bestehen aus diskohäsiven Tumorzellverbänden mit Quetschartefakten, nukleären Eindellungen (*moulding*) und nackten Kernen. Skalierung: 100 µm.

Der Begriff LCNEC wurde von Travis erstmals bezogen auf pulmonale NEN als gesonderte Kategorie vorgeschlagen (Travis et al., 1991) (Iyoda et al., 2013). Die Prognose von LCNEC wurde als intermediär zwischen der atypischer Karzinoide und der kleinzelliger Bronchialkarzinome angenommen. LCNEC sind gekennzeichnet durch große Kerne mit vesikulärem Karyoplasma und prominenten Nukleolen sowie

reichlich eosinophilem Zytoplasma (Abb.1). Das Wachstumsmuster der LCNEC ist vielgestaltig und reicht von soliden, undifferenzierten Tumorsträngen bis zu organoiden oder trabekulären Strukturen. Eine sichere histomorphologische Abgrenzung zu konventionellen, gering differenzierten AC ist in vielen Fällen problematisch. Daher wird bei gering differenzierten AC und beim geringsten Verdacht eines NEC der großzügige Einsatz immunhistochemischer Färbungen gegen Synaptophysin und CgA von den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für neuroendokrine Tumoren (ENETS) empfohlen (Garcia-Carbonero et al., 2016). Immunhistochemisch ist Synaptophysin als diagnostischer Marker gewöhnlich positiv, während Chromogranin A negativ ausfallen kann (Sorbye et al., 2013). Der Proliferationsindex liegt zwischen 55 und 80 % (Burke et al., 1991) (Crafa et al., 2003). Klinisch-pathologische Daten zu den LCNEC des Kolons sind nach wie vor spärlich. Ein bei Erstdiagnosestellung bereits fortgeschrittenes Tumorstadium mit tiefer Darmwandinfiltration, Nekrosen und zahlreichen Mitosen scheint typisch zu sein. Zusätzlich ist häufig eine Gefäß- oder Perineuralscheideninfiltration nachweisbar (Gaffey et al., 1990) (La Rosa et al., 2012) (Smith et al., 2014). Nach wie vor beziehen sich die meisten Arbeiten jedoch auf die Gesamtheit aller NEC ohne Spezifizierung des Subtyps (klein- oder großzellig).

1.3.3 Klinische Diagnostik

Die klinische Diagnostik von NEC unterscheidet sich deutlich von NET. Für NEC existieren keine gut etablierten Tumormarker (Sorbye et al., 2014). Eine spezifische endokrinologische Symptomatik als Ausdruck einer klinisch relevanten Hypersekretion von Hormonen und/ oder biogenen Aminen (endokrinologisches Syndrom) fehlt meist. Die Daten zu möglichen Serummarkern von NEC sind äußerst spärlich. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass CgA im Serum bei 66 % der untersuchten Patienten mit fortgeschrittenem GEP-NEC erhöht war (Sorbye et al., 2013).

Eine standardmäßige Messung von 5-Hydroxyindolessigsäure im Urin ist bei Patienten mit NEC nicht sinnvoll, da GEP-NEC so gut wie nie mit einer Serotonin-Sekretion einhergehen (Sorbye et al., 2013). Meistens sind NEC durch ihre Stoffwechselaktivität in der 18-Fluordesoxyglucose-Prositronen-Emissions-Tomografie (18-FDG-PET) kräftig positiv (Binderup et al., 2010). Das FDG-PET hat somit seine Berechtigung im Tumorstaging.

Somatostatinrezeptoren werden in GEP-NET häufig exprimiert (Uccella et al., 2018), ihre immunhistochemische Expression korreliert mit der Bildgebung (Brunner et al., 2017). Diagnostisch und therapeutisch eingesetzte Somatostatinanaloga haben die höchste Affinität für die Somatostatinrezeptoren 2A und 5 (SSTR2A und SSTR5) (Uccella et al., 2018). Die SSTR-Expression scheint bei NET mit einer besseren Prognose einherzugehen (Brunner et al., 2017) (Qian et al., 2016). Die Relevanz einer SSTR-basierten Bildgebung für NEC ist jedoch unklar (Binderup et al., 2010). Systematische Analysen zur Expression der SSTR fehlen.

1.3.4 Prognose

Die insgesamt noch spärlich vorliegenden Studien zeigen, dass kolorektale NEC hochaggressive Tumoren sind. 70 % der Patienten werden im Stadium IV nach UICC diagnostiziert (Carneiro F et al. (Hrsg.), 2010) (Bernick et al., 2004).

Das mediane Überleben für kolorektale NEC ist schlecht (Shafqat et al., 2015). Fast alle Patienten versterben innerhalb eines Jahres; das mediane Überleben wird mit viereinhalb bis zehn Monaten angegeben (Brenner et al., 2004) (Gaffey et al., 1990) (Bernick et al., 2004).

Diese Daten basieren jedoch entweder ausschließlich auf SCNEC (Brenner et al., 2004) oder wurden auf Basis heterogener Tumorkollektive erhoben. Eine Übersichtsarbeit stellt Überlebensdaten von 2500 Patienten mit GEP-NEC über einen Zeitraum von 40 Jahren zusammen (Sorbye et al., 2014). Hier wird zwischen LCNEC und SCNEC differenziert, aber es erfolgt keine organspezifische Aufschlüsselung, z. B. werden auch NEC von Ösophagus, Pankreas und Ampulla Vateri berücksichtigt. Die Analyse von Sorbye zeigt, dass bei 57 % der Patienten ein metastasiertes Tumorstadium bei Erstdiagnose vorliegt. Das mediane Überleben beträgt bei ausschließlich lokalisiertem Tumorstadium 38 Monate, bei lokoregionär nodal metastasierten Tumoren 16 Monate und bei Fernmetastasierung fünf Monate. Das Langzeitüberleben ist also selbst bei Patienten, die initial ein lokalisiertes Tumorstadium aufwiesen, niedrig. Die Bedeutung der Tumorhistologie (SCNEC versus LCNEC) als prognostischer Faktor ist unklar (Sorbye et al., 2014). In einer Studie ist das Fünf-Jahres-Überleben bei Patienten mit großzelligem GEP-NEC mit 32 % angegeben versus 6 % bei kleinzelligen GEP-NEC (Korse et al., 2013). Diese Differenz konnte in anderen Studien nicht bestätigt werden (Bernick et al., 2004) (Sorbye et al., 2013). Das stadienspezifische Fünf-Jahres-Überleben von LCNEC des

Pankreas scheint verglichen mit LCNEC des Magens und Kolons deutlich länger zu sein (Sorbye et al., 2013). Als negative Prognosefaktoren wurden schlechter Allgemeinzustand, hohe Proliferationsrate und erhöhte Lactatdehydrogenase-Konzentration im Serum und Thrombozytolyse herausgearbeitet (Sorbye et al., 2013). Auch Immunreaktivität der Tumorzellen für den Stammzellmarker CD117 (c-Kit) sowie das Vorliegen einer Gefäßinvasion scheinen negative prognostische Faktoren zu sein (La Rosa et al., 2012). Darüber hinaus wurde die proliferative Aktivität, bestimmt in Form des Ki-67-Index, als entscheidender prognostischer Faktor herausgestellt. Patienten in einem metastasierten Tumorstadium mit einem Ki-67-Index von <55 % zeigten ein besseres Überleben als Patienten mit einem höheren Ki-67-Index (Sorbye et al., 2013) (Sorbye et al. 2014). Die retrospektive NORDIC NEC Studie (Sorbye et al., 2013) schloss 305 Patienten mit G3 GEP-NEN ein und demonstrierte, dass es sich hierbei um eine heterogene Tumorgruppe handelt. Dies manifestiert sich u. a. in einem schlechteren Ansprechen auf eine platinbasierte Chemotherapie bei den Patienten mit einem Ki-67-Index von <55 % (15 % zu 42 %).

1.3.5 Molekularpathologie

GEP-NEN leiten sich von gastrointestinalen Stammzellen ab, welche sich in neuroendokrine Zellen differenzieren können. Wahrscheinlich leiten sich hoch- und niedrig differenzierte NEN von verschiedenen Stammzellen ab (Fazio und Milione, 2016) (Kidd et al., 2016) (Scardoni et al., 2014) (Furlan et al., 2004). Im Gegensatz zu NET weisen NEC eine deutlich höhere chromosomale Instabilität auf, da die beiden Tumorsuppressorgene TP53 und das Retinoblastomgen (Rb) mutiert und in der Folge beeinträchtigt sind (Furlan et al., 2003) (Pizzi et al., 2003) (Coriat et al., 2016) (Di Domenico et al., 2017). Wie an NET des Pankreas gezeigt wurde, spielen die bei NET mutierten Gene eher eine Rolle bei Chromatinstabilität, Histon-Modifizierung und DNA-Methylierung (Scarpa et al., 2017) (Coriat et al., 2016) (Di Domenico et al., 2017). Seltener werden Mutationen in Genen gefunden, die z. B. für Zellzyklus oder Angiogenese codieren (Di Domenico et al., 2017). NEC können gleichartige molekulare Aberrationen wie konventionelle AC des Kolorektums aufweisen (Vortmeyer et al., 1997) (Karkouche et al., 2012) (Kleist et al., 2014). Die bislang molekularpathologisch analysierten Marker bzw. möglichen molekularen Targets von NEC sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Untersuchte molekulare Zielstrukturen und ihre Bedeutung

P53			
Autor	**Pat. [n]**	**Organ**	**Ergebnis der Studie**
Pizzi et al., 2003	19	Magen (n=10) Kolorektum (n=9)	13/19 (68 %) NEC hatten p53-Überexpression, davon 7/10 (70 %) im Magen, 6/9 (67 %) im Kolorektum
O'Toole et al., 2010	60	Ileum (n=12) Kolorektum (n=5) Pankreas (n= 29) Sonstige (n=14)	In 14/60 (24 %) der NEN hohe Expression, überwiegend in NEN G2/G3.
Dacic et al., 2002	28	Lunge (n= 18) GI-Trakt (n= 5) Kopf und Hals (n=5)	Genotypisierung zeigt in SCNEC aller Lokalisationen allelisches Ungleichgewicht (*allellic inbalance*) und Punktmutationen in TP53.
Furlan et al., 2005	35	Lunge (n=6) Magen (n=7) Kolorektum (n=10) Sonstige (n=12)	Allelisches Ungleichgewicht des TP53 in 31/35 (89 %) der NEC unabhängig von Lokalisation. In 22/31 (71 %) dieser Fälle zusätzlich immunhistochemische p53-Expression.
Scardoni et al., 2014	6	Magen (n=2) Pankreas (n=2) Jejunum (n=1) Rektum (n=1)	In MANEC zeigten 83 % der exokrinen Komponente und 80 % der neuroendokrinen Komponente mit TP53-Mutation auch eine immunhistochemische p53-Überexpression. Immunhistochemische Negativität in einem Fall bedingt durch Stopcodon mit fehlender nukleärer p53-Stabilisierung.
Vortmeyer et al., 1997	9	Kolorektum	6/8 (75 %) der NEC zeigten ein allelisches Ungleichgewicht in TP53-Gen.
Takizawa et al., 2015	25	Kolorektum	In 22/25 (88 %) aberrante p53-Expression.
Vijayvergia et al., 2016	63	Pankreas (NEC: n=4) Kolorektum (NEC: n=9)	TP53-Mutationen waren mit 57 % die häufigsten Mutationen in NEC.
Namikawa et al., 2013	5	Magen	In 5/5 (100 %) der NEC immunhistochemische p53-Expression.
Yachida et al., 2012	30	Pankreas	Von 9 SCNEC und 10 LCNEC zeigten 95 % eine abnorme p53-Akkumulation.
Woischke et al., 2017	15	Kolorektum	In 10/15 (67 %) der MANEC wurden Mutationen im TP53 Gen gefunden.
Her2/neu			
Autor	**Pat. [n]**	**Organ**	**Ergebnis der Studie**
Iyoda et al., 2011	13	Lunge	Her2/neu in 2/13 (15 %) der LCNEC überexprimiert und in 2/13 (15 %) der LCNEC schwach exprimiert.
Ishida et al., 2014	51	Magen	Keine Überexpression in NEC.
Mikrosatelliteninstabilität			
Autor	**Pat. [n]**	**Organ**	**Ergebnis der Studie**
La Rosa et al., 2012	39	Kolorektum	MSI kommt in 6/39 (15 %) der NEC bzw. der MANEC vor.
Norose et al., 2017	1	Rektum	Keine MSI in einem MANEC.
Jesinghaus et al., 2017	27	Kolorektum	2/19 (11 %) der MANEC zeigten eine MSI.
Stelow et al., 2006	15	Kolorektum	1/15 (7 %) der SCNEC zeigte eine MSI.
Sahnane et al., 2015	89	Magen (n=36) Kolorektum (n=37) Sonstige (n=16)	MSI in 11/89 (12 %) der NEC und MANEC, davon zeigen 9/11 (82 %) der Patienten eine Methylierung des MLH1-Promotors.
Olevian et al., 2016	72	Kolorektum	0/10 (0 %) der NEC und 2/22 (9 %) der MANEC hatten eine MSI.

c-Kit (CD117)			
Autor	**Pat. [n]**	**Organ**	**Ergebnis der Studie**
Knösel et al., 2012	119	Dünndarm (n=31) Dickdarm (n=27) Pankreas (n=44)	15/119 (13 %) der GEP-NET immunhistochemische c-Kit-Überexpression, davon nur in einem PanNET eine c-Kit-Mutation.
Ishikubo et al., 2006	23	Magen (n=16) Kolorektum (n=4)	6/23 (26 %) der GEP-NEC hatten eine c-Kit – Überexpression, keine hatte eine c-Kit-Mutation
Iyoda et al., 2011	13	Lunge	10/13 immunhistochemisch überexprimiert in LCNEC.
Akintola-Ogunremi et al., 2003	66	Kolorektum	10/66 (15 %) der NEC immunhistochemisch c-Kit-Überexpression, keine c-Kit-Mutation.
KRAS, Codon 12 + 13			
Autor	**Pat. [n]**	**Organ**	**Ergebnis der Studie**
Dacic et al., 2002	28	Lunge (n= 18) GI-Trakt (n= 5) Kopf/ Hals (n=5)	Keine KRAS-Mutationen in SCNEC aller Lokalisationen.
Iyoda et al., 2011	13	Lunge	Keine KRAS-Mutationen in LCNEC.
Karkouche et al., 2012	12	Kolorektum	4/12 (33 %) der MANEC zeigten KRAS-Mutationen.
Norose et al., 2017	1	Rektum	Keine KRAS-Mutation in einem MANEC.
Jesinghaus et al., 2017	27	Kolorektum	7/27 (21 %) von 19 MANEC und 8 NEC haben eine KRAS-Mutation.
Takizawa et al., 2015	25	Kolorektum	2/24 (83 %) der NEC haben eine KRAS-Mutation.
Woischke et al., 2017	15	Kolorektum	9/15 (60 %) der MANEC zeigten KRAS-Mutationen in jeder Komponente.
Olevian et al., 2016	72	Kolorektum	Von 10 NEC sind 80 % KRAS-Wildtyp. Von 19 MANEC sind 84 % KRAS-Wildtyp.
Vijayvergia et al., 2016	63	Pankreas (NEC: n=4) Kolorektum (NEC: n=9)	KRAS-Mutationen kommen in 30 % der NEC vor.
Sahnane et al., 2015	89	Magen (n=36) Kolorektum (n=37) Sonstige (n=16)	KRAS-Mutationen kommen in 17 % der NEC/MANEC vor.
Yachida et al., 2012	30	Pankreas	2/7 (29 %) der NEC wiesen KRAS-Mutationen auf.
BRAF			
Autor	**Pat. [n]**	**Organ**	**Ergebnis der Studie**
Jesinghaus et al., 2017	27	Kolorektum	Von 19 MANEC und 8 NEC sind 37 % der Tumoren BRAF-mutiert.
Sahnane et al., 2015	89	Magen (n=36) Kolorektum (n=37) Sonstige (n=16)	BRAF-Mutationen kommen in 7 % der NEC/MANEC vor.
Olevian et al., 2016	72	Kolorektum	Von 10 NEC sind 60 % BRAF-mutiert. Von 19 MANEC sind 58 % BRAF-mutiert.
Takizawa et al., 2015	25	Kolorektum	Einer von 24 NEC ist BRAF-mutiert (4 %).
Vijivergia et al., 2016	63	Pankreas (NEC: n=4) Kolorektum (NEC: n=9)	BRAF-Mutationen kommen in 13 % der NEC vor.
Karkouche et al., 2012	12	Kolorektum	2/12 (17 %) der MANEC zeigten BRAF-Mutationen.
EGFR, Exon 18, 19, 20			
Autor	**Pat. [n]**	**Organ**	**Ergebnis der Studie**
Iyoda et al., 2011	13	Lunge	1/13 (8 %) der LCNEC wies eine EGFR-Mutation auf.
Ito et al., 2017	35	Lunge	EGFR-Missense-Mutation (L858R) in einem kombiniertes LCNEC / Adenokarzinom.

BRAF Murines Sarkomvirus Onkogen Homolog B1, **c-Kit** Kit Protoonkogen Rezeptor-Tyrosinkinase, **EGFR** Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor, **GEP-NEC** gastroenteropankreatische neuroendokrine Karzinome, **GEP-NET** gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumoren, **Her2/neu** humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2, **KRAS** Kirsten Ratten Sarkomvirus Onkogen Homolog, **LCNEC** großzelliges neuroendokrines Karzinom, **MANEC** gemischt adenoneuroendokrines Karzinom, **MMR-Proteine** *Mismatch*-Reparaturproteine, **MSI** Mikrosatelliteninstabilität, **NEC** neuroendokrines Karzinom, **NEN** neuroendokrine Neoplasie, **P53** Protein p53, **SCNEC** kleinzelliges neuroendokrines Karzinom, **TP53** Tumorsuppressorgen TP53

1.3.6 Therapeutische Strategien

Die meisten molekularen Entdeckungen und therapeutischen Fortschritte wurden auf dem Gebiet der NET erzielt (Sorbye et al., 2014) (Garcia-Carbonero et al., 2016). Weitaus weniger weiß man über die kolorektalen NEC. Insbesondere gibt es bislang keine publizierten prospektiven Therapie-Studien, in denen extrapulmonale NEC evaluiert wurden (Sorbye et al., 2014). Die ENETS Leitlinien (Garcia-Carbonero et al., 2016) empfehlen für GEP-NEC mit lokalisierter Erkrankung eine Kombination aus platinbasierter Chemotherapie mit lokalen Verfahren wie Operation oder Bestrahlung. Der Nutzen von Somatostatin-Analoga oder Peptid-Rezeptor-Radionukleotid-Therapie (PRRT) ist nicht belegt, auch wenn einige NEC SSTR2A exprimieren (Fjällskog et al., 2003) (Sclafani et al., 2011) (Srirajaskanthan et al., 2009).

Die Therapiestrategien leiten sich somit im Wesentlichen von den Behandlungsschemata der SCLC ab (Brennan et al., 2010) (Garcia-Carbonero et al., 2016). Die Sinnhaftigkeit dieser Therapieempfehlungen ist jedoch durchaus kritisch begleitet worden, da Unterschiede zwischen pulmonalen und extrapulmonalen NEC offensichtlich sind: Bei den pulmonalen NEC gibt es eine starke Assoziation zum Zigarettenrauchen, Metastasen in das zentrale Nervensystem sind häufiger und das Ansprechen auf eine platinhaltige Chemotherapie ist besser (Brennan et al., 2010) (Cicin et al., 2007) (Terashima et al, 2012).

1.4 Zielsetzung und Fragestellungen

Für die vorliegende retrospektive Studie wurden Operationspräparate kolorektaler Karzinome von 455 Patienten aus zwei Darmzentren systematisch reevaluiert mit dem Ziel, die Frequenz von NEC des Dickdarms an einem großen Kollektiv zu untersuchen. Arbeitshypothese war, dass die Inzidenz von NEC möglicherweise deutlich höher liegt als bislang in der Literatur und auch den publizierten ENETS Leitlinien vermutet (Garcia-Carbonero et al., 2016). Bislang nicht ausreichend publizierte Parameter zur Genetik, der diagnostischen Immunhistochemie, einer therapeutisch und prognostisch

orientierten Molekularpathologie wurden an dem Kollektiv identifizierter NEC analysiert. Darüber hinaus wurde aus zwei Patienten mit LCNEC eine Zelllinie etabliert und in der vorliegenden Arbeit die pathologischen Basisparameter für deren Charakterisierung herausgearbeitet.

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit lauten:

1. Frequenz primärer NEC
2. Epidemiologie und klinische Pathologie von NEC
3. Hereditärer Hintergrund und funktionelle Aktivität von NEC
4. Immunhistochemische Charakterisierung von NEC
5. Molekularpathologische Analyse von NEC
6. Etablierung und Charakterisierung von zwei NEC Zelllinien

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Hersteller
ABI PRISM Sequencer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Abzug	Düperthal, Karlstein, Deutschland
AX Mikroskop	Olympus Optical, Hamburg, Deutschland
Brutschrank 56 C und 100 C	Köttermann, Uetze, Hänigsen, Deutschland
Cool Care	Van der Heijden, Dörentrup, Deutschland
Einbettautomat Tissue-Tek VIP 5E-F2	Sakura Finetek, Staufen, Deutschland
Eindecker Tissue-Tek Film E2	Sakura Finetek, Staufen, Deutschland
Eppendorf Zentrifuge	VWR, Darmstadt, Deutschland
EZ1 Biorobot	Qiagen, Hilden, Deutschland
Färbeautomat Tissue Tek Prisma ES2	Sakura Finetek, Staufen, Deutschland
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fluoview Laser Scanning Mikroskop	Olympus Optical, Hamburg, Deutschland
Gefrierschrank, 80 C	Liebherr, Biberach an der Riß, Deutschland
Heißluftinkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Heiztisch	Welabo, Nettetal, Deutschland
Immunostainer	Biogenex, Fremont, USA
Medimachine Systeme	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Monotherm Magnetrührer	Variomag, USA
Oberlichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
PCR CFX96 mit C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad, München, Deutschland
PCR Maschine Mastercycler EP	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten 0,5-10 µl	VWR, Darmstadt Deutschland
Pipetten 100 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten 100–1000 µl	VWR, Darmstadt, Deutschland
Pipetten 10–100 µl	VWR, Darmstadt, Deutschland
Power Supply	Biometra, Göttingen, Deutschland
Rüttler	IKA, Steuffen, Deutschland
Schlittenmikrotom	Microm, Walldorf, Deutschland
Spektrometer	Landgraf, Langenhagen, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Mikro 20 Typ 2004	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Transmission-Elektronenmikroskop EM 109 R	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Trockenschrank, Fa. Heraeus	Heraeus, Hanau, Deutschland
Ultracut	Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad	Medax, Neumünster, Deutschland
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Diamantmesser	Diatome, Biel, Schweiz
Easy-Mould/Ausgussform	LKB, Wien, Österreich
Glasküvetten	Hellma, Müllheim, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
PCR-Softtubes	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg, Deutschland
Sialinisierte Objektträger	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Standreagenzgläser	Welabo, Nettetal, Deutschland
Stuhlröhrchen ohne Spatel	Zentrallager, UKD, Deutschland
Tubes	LTF, Wasserburg, Deutschland
Whatman Filter	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland

2.3 Chemikalien

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1,2-Epoxypropan	Roth, Karlsruhe, Deutschland
3,3'-Diaminobenzidin	Dianova, Hamburg, Deutschland
Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung 30 %	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ammoniumpersulfat-Lösung, 10 %	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Aqua dest	Apotheke, UKD, Deutschland
Azur II	Merck, Darmstadt, Deutschland
Biotin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Biotin-gekoppelter sekundärer Antikörper	DCS, Hamburg, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DEPC-H2O	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsäure-Natriumsalz	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMP 30	Serva, Heidelberg, Deutschland
dNTP Mix	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dodeanylbernsteinsäureanhxdrid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Essigsäure, 10 %	Apotheke, UKD, Deutschland
Ethanol	Apotheke, UKD, Deutschland
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eukitt	Kindler, Freiburg, Deutschland
Eukobrom	Tetanel, Norderstedt, Deutschland
Fixierlösung, Fotoentwicklung	Tetanel, Norderstedt, Deutschland
Formaldehyd, 37 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutaraldehyd 25 %	Serva, Heidelberg, Deutschland
Glycinether	Serva, Heidelberg, Deutschland
Glyzerin, 10 %	Apotheke, UKD, Deutschland
H_2O_2	Merck, Darmstadt, Deutschland

Hämalaun	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Hot Star Taq	Qiagen, Hilden, Deutschland
Längenstandard 50bp Marker	Fermentas, Waltham, USA
Methylenblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methylnadicanhydrid	Serva, Heidelberg, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat, 270 mM	Apotheke, UKD, Deutschland
Natriumtetraborat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge, 0,5 M	Merck, Darmstadt, Deutschland
Osmium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd 4 %	Apotheke, UKD, Deutschland
pH9 Puffer	Roche, Basel, Schweiz
Pronase E	Merck, Darmstadt, Deutschland
Proteinase K	Merck, Darmstadt, Deutschland
RPMI Medium	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salpetersäure, 1 %	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Salzsäure 1 M	Merck, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin / HRP, gebrauchsfertig	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
TEMED	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trägerfolie GelBondPag	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Tris	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	VWR, Darmstadt, Deutschland

2.4 Kits

Tabelle 6: Kits

Kit	Hersteller
BigDyeTerminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
EZ1 DNA tissue kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

3 Methoden

3.1 Klinische Pathologie

Für die Studie wurden sämtliche Dickdarm-Operationspräparate aus zwei größeren, von der Deutschen Krebsgesellschaft zertifizierten Darmzentren (Universitätsklinikum Düsseldorf und Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf) der Jahre 2002, 2003, 2009 und 2010 ausgewertet. Die systematische Datenbankrecherche erfolgte mit dem Pathologie Befund- und Dokumentationssystem dc-Pathos (dc Systeme Informatik GmbH, Heiligenhaus, Deutschland). Suchstichworte waren: „Dickdarm“, „Adenokarzinom“, „Dickdarmteilresektat“, „Rektosigmoid“ und „Hemikolektomiepräparat“.

Die vorgelegte Studie wurde von der Ethikkommission des UKD bewilligt (Studiennummer 4191, 27. Februar 2013).

3.2 Gewebeaufarbeitung

Die makroskopische und histopathologische Aufarbeitung erfolgte gemäß der aktuellen S3-Leitlinie zur anatomisch-pathologischen Diagnostik des kolorektalen Karzinoms, angelehnt an die von den Fachgesellschaften formulierten Vorgaben (S3 Leitlinie „Kolorektales Karzinom“, 2017).

Die entnommenen Gewebeproben wurden in gepuffertem 4%igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden 3–4 µm dünne Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) sowie mit Periodic acid-Schiff-(PAS) gefärbt. Konventionell histologisch wurde die Zuordnung zu einem spezifischen Wachstumsmuster gemäß der WHO-Klassifikation 2010 vorgenommen. Von sämtlichen Patienten mit Dickdarmkarzinomen wurde jeweils eine repräsentative Gewebeprobe immunhistochemisch mit den spezifischen neuroendokrinen Markern Synaptophysin und Chromogranin A analysiert. Ausgeschlossen wurden rektale Karzinome nach neoadjuvanter Radio- oder Radiochemotherapie, die bekanntermaßen eine fokale oder diffuse neuroendokrine Differenzierung aufweisen können (Shia et al., 2002).

Integrale Bestandteile der Befundung waren die Angabe des Tumortyps nach WHO- und UICC-Klassifikation, das lokale Tumorstadium (pT), der Metastasierungsstatus in

regionären Lymphknoten unter Angabe der insgesamt entfernten Lymphknoten (pN), das Grading sowie die Bewertung der Resektionsränder (R-Status). Zusätzlich wurden Parameter wie die Lymphgefäß-, Venen- und Perineuralscheideninfiltration dokumentiert (L, V und Pn) (Carneiro F et al. (Hrsg.), 2010) (Wittekind C (Hrsg.), 2017).

3.3 Immunhistochemie

Von den formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeproben wurden 2-3µm dicke Schnittpräparate angefertigt, welche 15 Minuten in Avidinlösung in einer Küvette sialinisierten. Nach Spülen mit Leitungswasser erfolgte eine 15minütige Inkubation in Biotinlösung. Der Nachweis spezifischer Antigene erfolgte über indirekte Immundetektion. Dazu wurde der liegende Objektträger mit 150µl primärem (nicht-markierten) Antikörper (Tabelle 8) bei 37 in feuchter Kammer inkubiert. Danach wurde der Primärantikörper über einen gelabelten, speziesspezifischen Sekundärantikörper, welcher an Enzyme gekoppelt ist, detektiert. Unter Schwenken wurde der liegende Objektträger mit 200 µl des sekundären Antikörpers inkubiert. Der Antikörpernachweis erfolgte über eine nachgeschaltete Enzym-Substrat-Chromogen-Reaktion. Als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase des Sekundärantikörpers diente Diaminobenzidin (DAB), welches nach Katalyse als braunes Reaktionsprodukt detektierbar ist. Danach erfolgte eine 15minütige Inkubation des liegenden Objektträgers mit 200µl Streptavidin/ Meerrettich-Peroxidase. Nach jedem Inkubationsschritt wurde erst mit Wasser, danach mit 0,03 % Triton X 100 in Aqua dest. gespült. Als nächster Schritt wurde der liegende Objektträger 10 Minuten mit 150µl DAB Chromogen / Substrat (20 : 1) inkubiert, danach wurde fünf Minuten mit Leitungswasser gespült. Die Anfärbung der Zellkerne wurde mit Hämalaun durchgeführt. Nach Spülen mit Leitungswasser wurden die Schnitte zunächst in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %), dann in Xylol getrocknet und anschließend mit Eukitt eingedeckt. (Sproll et al., 2017) (Cupisti et al., 2008) (Krieg et al., 2014) (Lindl und Gstraunthaler, 2008).

Tabelle 7: Primäre Antikörper Immunhistochemie

Antigen	Katalognummer	Hersteller	Verdünnung	Spezies
Synaptophysin	NCL-L-Synap 299	Novocastra, Berlin, Deutschland	1:100	Maus, monoklonal
CgA	MAB 5268	Chemikon, Schwalbach, Deutschland	1:1000	Maus, monoklonal
VMAT 1	H-V001	Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA	1:1500	Kaninchen, polyklonal
VMAT 2	H-V003	Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA	1:1500	Kaninchen, polyklonal
SSTR 2A	SS-800	Gramsch Laboratories, Schwabhausen, Deutschland	1:10	Kaninchen, polyklonal
SSTR 5	SS-838	Gramsch Laboratories, Schwabhausen, Deutschland	1:5	Kaninchen, polyklonal
Mib-1	M7240	Dako, Hamburg, Deutschland	1:500	Maus, monoklonal
Pan-CK	MU071-UC	Biogenex, Fremont, CA, USA	1:250	Maus, monoklonal
CK7	MSK 032	Zytomed, Berlin, Deutschland	1:100	Maus, monoklonal
CK 8	503-3264	Zytomed, Berlin, Deutschland	1:100	Kaninchen, polyklonal
CK 18	MU143-UC	Biogenex, Fremont, CA, USA	1:2500	Maus, monoklonal
CK 20	M7019	Dako, Hamburg, Deutschland	1:200	Maus, monoklonal
CEA	M7072	Dako, Hamburg, Deutschland	1:300	Maus, monoklonal
TTF1	NCL-L-TTF	Novocastra, Berlin, Deutschland	1:200	Maus, monoklonal
CDX2	MU392A-UC	Biogenex, Fremont, CA, USA	1:20	Maus, monoklonal
islet-1	AB 20670	Abcam, Großbritannien	1:600	Kaninchen, polyklonal
c-Kit	566	MBL, Biozol, Deutschland	1:800	Kaninchen, polyklonal
p53	OP 43	Calbiochem, USA	1:200	Maus, monoklonal
HER2/neu	A 0485	Dako, Hamburg, Deutschland	1:600	Kaninchen, polyklonal
MLH1	554073	BD Biosciences, USA	1:240	Maus, monoklonal
MSH2	NA 27	Calbiochem, USA	1:80	Maus, monoklonal
PMS2	556415	BD Biosciences, USA	1:300	Maus, monoklonal
MSH6	610919	BD Biosciences, USA	1:600	Maus, monoklonal
β-Catenin	NCL-B-CAT	Leica, Großbritannien	1:50	Maus, monoklonal

CDX2 Caudal Type Homeobox Transkriptionsfaktor 2, **CEA** Carcinoembryonales Antigen, **CgA** Chromogranin A, **CK** Zytokeratin, **c-Kit** Kit Protoonkogen Rezeptor-Tyrosinkinase, **Her2/neu** Humaner epidermaler Wachstumsfaktor 2, **MLH1** MutL Homolog 1, **MSH** MutS Homolog, **p53** Tumorprotein p53, **PMS2** PMS 1 Homolog 2, **SSTR** Somatostatinrezeptor, **TTF1** Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1, **VMAT** vesikulärer Monoamintransporter.

3.4 Molekularpathologische Untersuchungen

3.4.1 DNA-Isolierung aus Paraffingewebe

Pro Patient wurde ein ungefärbtes Schnittpräparat mit einer Schnittdicke von 10µm auf einen Objektträger aufgezogen und für 15 Minuten im Heizofen bei 60 C getrocknet. Das Tumorareal wurde auf dem H&E-gefärbten Objektträger mit einem Filzstift markiert. Der Objektträger wurde durch zweimalige Inkubation in Xylol für jeweils 10

Minuten entparaffiniert und durch zweimalige Inkubation in Ethanol für jeweils 5 Minuten entwässert und anschließend ca. fünf Minuten getrocknet. Anhand der gekennzeichneten Areale auf dem H&E-Schnitt wurde mit einer Pipettenspitze, welche zuvor mit Extraktionspuffer (G2-Puffer) angefeuchtet worden war, das Tumorgewebe vom Objektträger abgelöst und in 380µl Pufferlösung überführt. Das Gewebe wurde in Puffer mit 20µl Proteinase K über Nacht bei 56 C unter Schütteln lysiert. Am nächsten Tag wurden nicht verdaute Gewebereste durch fünfminütige. Zentrifugation bei 13000 rpm entfernt. Die 20µl der DNA-haltigen Lösung wird in Sample-Tubes aus dem Extraktionskit überführt. Der Extraktionsroboter wird mit den Einsätzen, Spitzen, Sample-Tubes und Elutionsröhrchen bestückt und mit den Einstellungen „Tissue“, „Startvolumen 200µl“ und „Elutionsvolumen: 50µl“ gestartet (Messner et al., 2013) (Baldus et al., 2010) (Fairley et al., 2012) (Klopfleisch et al., 2011).

3.4.2 DNA-Messung

Der DNA-Gehalt wurde mithilfe der Fotometrie quantifiziert. DNA absorbiert UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die DNA wird in einer Küvette von einer Strahlenquelle mit dieser Wellenlänge bestrahlt und absorbiert konzentrationsabhängig einen gewissen Teil der Strahlung. Je nach Intensität der austretenden Transmissionsstrahlung errechnet das Fotometer die DNA-Konzentration. Zunächst wurde hierzu eluierte DNA 1:50 verdünnt (2µl DNA + 98µl TE-Puffer). Ein Tube mit 400µl TE-Puffer wurde zum Spülen der Küvette und für die Blank-Messung angelegt. Am Fotometer wird das Programm 7 (ds DNA) eingestellt und die Verdünnung eingegeben (2 + 98). Die Küvette wurde vor Gebrauch mit TE-Puffer gespült. 100µl TE-Puffer wurden als Eich-Wert gemessen. 100µl der Probe wurden eingefüllt und als Sample gemessen. Die restlichen Proben folgten im Anschluss. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt automatisch durch das Fotometer (Messner et al., 2013) (Baldus et al., 2010) (Nicklas und Buel, 2003) (Kriek et al., 1984).

3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Um genug DNA aus den zur Verfügung stehenden Gewebeschnitten zu gewinnen, musste die DNA mithilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) vervielfältigt werden. Dies geschah über einen sich wiederholenden Zyklus aus Denaturierung, Abkühlung (*annealing*) und Elongation mithilfe einer thermostabilen Polymerase (Taq-

Polymerase). Bei der Denaturierung wurde der DNA-Doppelstrang durch Hitze aufgetrennt. Durch das anschließende *annealing* lagern sich Primer (Tabelle 9) an ihre komplementären Sequenzen an. Bei der Elongation wurde das Gemisch nun wieder auf das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase erhöht, welche komplementäre Nukleotide an die freien 3'Enden der Primer anbaut (Suttorp und Schmitz, 1997) (Arnheim, 1990).

Tabelle 8: Primersequenzen für Polymerase-Kettenreaktion

Gen	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
c-Kit Exon 9	5'-TTTGGAAAGCTAGTGGTTCA-3'	5'-ATGGTAGACAGAGCCTAAAC-3'
c-Kit Exon 11	5'-CTATTTTTCCCTTTCTCCCC-3'	5'-TACCCAAAAAGGTGACATGG-3'
EGFR Exon 18	5'-TCCAAATGAGCTGGCAAGTG-3'	5'-TCCCAAACACTCAGTGAAACAA-3'
EGFR Exon 19	5'-CATGTGGCACCATCTCACA-3'	5'-AGCAGGGTCTAGAGCAGAGC-3'
EGFR Exon 21	5'-CCATGATGATCTGTCCCTCA-3'	5'-CCTGGTGTCAGGAAAATGCT-3'
KRAS Exon 2	5'-AGGCCTGCTGAAAATGACTGAA-3'	5'-AAAGAATGGTCCTGCACCAG-3'
BRAF Exon 15	5'-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG-3'	5'-AGCCTCAATTCTTACCATCCA-3'

BRAF Murines Sarkomvirus Onkogen Homolog B1, **c-Kit** Kit Protoonkogen Rezeptor-Tyrosinkinase, **EGFR** epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor, **KRAS** Kirsten Ratten Sarkomvirus Onkogen Homolog

PCR-Ansätze:

Kontrolle: DNA aus Blut (10 ng/µl)

Primer Stock: 100 µM
20µM: 10µl+ 40µl DEPC-H_2O

10µM: 5µl+ 45µl DEPC-H_2O

5µM: 2,5µl+ 47,5µl DEPC-H_2O

1. K-: Wasser statt Probe
2. Pat.-DNA
3. Pat.-DNA 1 : 5 verd.
4. K+ DNA (10 ng/µl)

Wenn Proben-DNA Konzentration >100 ng/µl ist, dann 1:5 (5µl+20µl dH_2O) und 1:50 (2µl+18µl dH_2O) einsetzen. Ansetzen der PCR in 0,2 ml Reaktionsgefäßen.

PCR-Ansatz

2		µl	Template-DNA (bzw. H_2Ofür die Negativkontrolle)
+	12,9	µl	H_2O
+	0,5	µl	Primer sense
+	0,5	µl	Primer antisense
+	2	µl	10x Puffer (incl. 15 mM MgCl)

+	2	µl	dNTPs
+	0,1	µl	Taq
	20	µl	Endvolumen

Temperaturprogramm am PCR-Cycler je nach Exon einprogrammieren

Temperatur:	Zeit:	Zyklen:	
94 C	10 sec.		= Denaturierung
50 C	45 sec.	x45 (x50 EGFR, Exon18)	= Annealing
72 C	4 min.		= Elongation
4 C	90 min.		Reaktionstopp

Anschließend wurden die Proben in den PCR-Cycler gestellt und das Programm gestartet.

3.4.4 Elektrophorese von PCR-Produkten

Bei der Gelelektrophorese wurden DNA-Moleküle in einem Acrylamidgel durch Anlegen einer elektrischen Spannung aufgetrennt. Zur Vorbereitung der Gelgieß-Kassette wurden Glasplatten mit 70%igem Alkohol abgewischt. Auf die Deckplatte wurden 2-4ml Wasser gegeben, die Trägerfolie wurde mit Schutzpapier oben (hydrophile Seite oben) luftblasenfrei aufgelegt und angedrückt. Zur Herstellung der Gellösung für 12%iges Acrylamidgel wurde in einem Falcon-Röhrchen 8ml (2 x 4 ml) Acrylamid-Gel, 8ml (2 x 4 ml) Tris/Sulfat (4^0C), 4ml Wasser (zweifach destilliert) und 140µl (2 x 70 µl) Ammoniumpersulfat-Lösung gemischt. 7,1µl TEMED wurden erst unmittelbar vor dem Gelgießen dazugegeben. Die Gellösung wurde auf eine Glasplatte mit 33 Taschen gegossen. Das Gel polymerisierte für mindestens 45 Minuten aus. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 14 C im Laborkühler. Die Trägerfolie wurde zusammen mit dem Gel auf die Elektrophoreseeinheit gelegt. Je 3,5µl PCR-Produkt bzw. 50bp (1:40) wurden direkt in die Geltaschen hinein pipettiert. Puffergetränkte Filterpapierstreifen wurden direkt auf das Gel gelegt und angedrückt. Die Elektrodenplatte wurde mit Elektroden auf die Filterstreifen aufgelegt. Die Elektrophorese lief bei konstanter Stromstärke (0,5mA/cm Gelbreite; ~30mA). Die DNA – welche durch ihre Phosphatreste negativ geladen ist – wanderte in Richtung der positiv geladenen Anode, wobei dies umso schneller geschah, je kleiner das DNA-

Fragment ist. Der Gellauf war beendet, sobald die Lauffront die Filterpapierstreifen an der Anode erreichte (Laufdauer ca. 45–60 Minuten). Danach wurden die Banden mit Silberfärbung sichtbar gemacht: Hierfür wurde das Gel fünf Minuten in 1%iger Salpetersäure inkubiert und danach mit Aqua dest. gespült. Es folgten mindestens 20 Minuten Inkubation in 100ml 0,4%igem Silbernitrat. Zweimal wurde ca. eine Minute mit Wasser gespült und die Proben dreimal eine Minute auf einen elektrischen Probenschüttler gegeben. 200ml Natriumcarbonat/ 150µl Formaldehyd wurde in drei Portionen zum Gel gegeben – der erste Wechsel erfolgte nach Dunkelwerden des Entwicklers, der zweite Wechsel nach dem Auftreten der ersten Banden. Wenn alle Banden des Längenstandards erkennbar sind, welcher als Referenz-DNA diente, wurde der Entwickler abgegossen und 10%ige Essigsäure zugeben (zum Stoppen der Reaktion). Danach wurde mindestens zehn Minuten unter Schütteln inkubiert. Die Essigsäure wurde verworfen und das Gel mit 10%igem Glyzerin für mindestens eine Stunde inkubiert. Nach Abwaschen der Polyacrylamidreste wurde das Gel zurechtgeschnitten und eingeschweißt (Cariello et al. 1993).

3.4.5 Aufreinigung der DNA und Sequenzierung nach Sanger

Bei der DNA-Aufreinigung wurden nicht eingebaute dNTPs, Salze und Enzyme entfernt. Danach wurde die DNA-Doppelhelix durch Erwärmung denaturiert, woraufhin Einzelstränge zur Verfügung standen. Ausgehend von einem Primer wurde durch das Enzym DNA-Polymerase einer der beiden komplementären DNA-Stränge verlängert. In vier sonst gleichen Ansätzen, die alle vier Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) enthielten, wurden unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) zugegeben, welche einen Kettenabbruch bedingten. In der Folge entstanden DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge (Malapelle et al., 2012). Die entstehenden Kettenabbruchprodukte wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mithilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Die ddNTPs am Ende jedes DNA-Fragments zeigten durch Fluoreszenz unterschiedliche Farben und können so von einem Detektor erkannt werden. Am Detektor erscheinende Farbsignale (= Chromatogramm) gaben durch ihre Abfolge direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Strangs wieder. Computerprogramme (Chromas Lite) werteten die erhaltene Basensequenz weiter aus (Gao et al., 2010).

Die Aufreinigung und Sequenzierung erfolgte mithilfe des BigDye® Terminator 3.1 Cycle Sequenzing Kit (Applied Biosystems). Zunächst wurden die Komponenten des Kits aufgetaut und ebenso wie die Primer auf Eis gelagert. Dann wurden die Tubes 2–3 Sekunden geschüttelt und ebenso lange zentrifugiert. Die DNA-Probe, der BigDye TM Terminator 3.1 Ready Reaction Mix, forward- und reverse-Primer und Aqua dest. wurden auf 10 µm pipettiert. Die Tubes wurden geschüttelt und zentrifugiert. Für die Sequenzierung wurden die Tubes in den Thermocycler gesetzt und auf 20µL Volumen aufgefüllt (Baldus et al., 2010). Die Sequenzierung erfolgte vollautomatisch durch einen Genetic Analyzer Abi Prism 3130XL am Biologisch-medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

3.5 Untersuchungen an der Zellkultur

3.5.1 Etablierung der Zellkultur

Direkt nach der Resektion wurde eine 5 mm durchmessende Gewebeprobe des Tumors zwei Minuten mechanisch in 1ml RPMI mit Medimachine Systems fragmentiert. Die Zellsuspension wurde in 6-well-Platten aufgefüllt zu einem Endvolumen von 2ml mit RPMI Medium. Dieses war angereichert mit 10%igem FCS, Penicillin und Streptomycin. Die Kultivierung und Lagerung erfolgte bei 37 C in einer Atmosphäre mit 5%igem Kohlendioxidgehalt. Weiterhin wurde die humane Kolonkarzinom-Zelllinie HCT 116 als Kontrolle vom American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) bereitgestellt und in McCoy’s 5A Medium mit 10 % FCS kultiviert (Krieg et al., 2014).

3.5.2 Immunhistochemie

Die Zellkultur wurde immunhistochemisch charakterisiert (vgl. Kapitel 3.3). Es wurden die gleichen Primärantikörper wie für das Paraffin-eingebettete Gewebe eingesetzt (vgl. Tabelle 7).

3.5.3 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Mithilfe des Laserscanning-Mikroskops ist es möglich, die Kolokalisation bzw. topografische Verteilung von mehreren Antigenen simultan innerhalb einer Zelle mit hoher Auflösung nachzuweisen. Im Gegensatz zum normalen Lichtmikroskop nimmt das Laserscanning-Mikroskop kein zweidimensionales Gesamtbild auf, sondern jeder

Punkt des Objekts wird einzeln gemessen und danach wieder zu einem zweidimensionalen Bild zusammengesetzt (Hörsch et al., 1992) (Anlauf et al., 2004). Für die doppelte Immunfluoreszenz wurden die Schnittpräparate mit zwei unterschiedlichen Primärantikörpern in entsprechender Verdünnung benetzt (Tabelle 9) (Anlauf et al., 2003).

Tabelle 9: Primäre Antikörper für konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Antigen	Katalognummer	Quelle	Verdünnung	Spezies
Synaptophysin	A0010	DAKO, Hamburg, Deutschland	1:50	Kaninchen, polyklonal
Synaptophysin	M0776	DAKO, Hamburg, Deutschland	1:15	Maus, monoklonal
ChromograninA	WE-14 Lenny 9	Boehringer, Mannheim, Deutschland	1:10000	Kaninchen, polyklonal
ChromograninA	LK2H10	Boehringer, Mannheim, Deutschland	1 : 200/ 1:20 (f)	Maus, monoklonal

Danach folgte eine Markierung mit speziesspezifischen Sekundär-Antikörpern welche an die Alexa-Fluorochrome A647, A594 oder A488 oder an Cy2 oder Cy3 gekoppelt sind (Tabelle 10). Die streptavidingekoppelten Fluorochrome wurden kombiniert mit biotinylierten speziesspezifischen Sekundär-Antiseren welche das entsprechende Fluorochrom enthielten.

Tabelle 10: Verwendete Fluorochrome für die konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Fluorochrom	Quelle
A647, A594, A488	MoBiTec, Göttingen, Deutschland
Cy2, Cy3	Dianova, Hamburg, Deutschland

Für die doppelte Immunfluoreszenz wurden die Schnitte analysiert und mit einem AX70 Mikroskop fotografiert. Dieses war ausgestattet mit passenden Filtern für die Diskriminierung zwischen den unterschiedlichen Fluorochromen. Die konfokale doppelte Immunfluoreszenz-Analyse wurde mit einem Fluoview Laser Scanning Mikroskop durchgeführt (Anlauf et al., 2006) (Anlauf et al., 2003) (Krieg et al., 2014).

3.5.3 Elektronenmikroskopie

Die Transmissionselektronenmikroskopie ermöglicht eine Auflösung von kleiner als 1nm, also im Bereich von atomaren Abständen. Hierbei emittiert eine Glühkathode Elektronen, welche das zu untersuchende Präparat durchdringen und durch eine nachgeschaltete Linse vergrößern. Die Schnitte müssen hierfür ultradünn sein (70-100 nm), damit der Elektronenstrahl die Probe durchdringen kann (Knowles, 1965) (Inomoto und Osamura, 2009).

Das Gewebe wurde in Glutaraldehyd fixiert, was zu einer Vernetzung und Stabilisierung der Proteine führte. Das in Glutaraldehyd fixierte Gewebe wurde in 1x1x1 mm große Stücke geteilt. Diese wurden im Glasröhrchen mit Cacodylatspülpuffer gespült und bei Raumtemperatur in 1%iger Osmiumlösung gelagert. Danach wurde erneut im Cacodylatpuffer gespült, anschließend in aufsteigender Alkoholreihe jeweils zehn Minuten in 50%igem/ 70%igem, 80%igem und 90%igem Alkohol behandelt. Die Proben wurden zweimal 10 Minuten in Alkohol und ein Mal 10 Minuten in Alkohol mit Feuchtigkeitsindikator geschwenkt. Es folgte eine zweimal 15minütige Behandlung mit Propylenoxyd, dann wurde das Gewebe eine Stunde in Epon-Einbett-Lösung/ Propylenoxid im Mischverhältnis 1 : 1 gelagert. Die Prozedur wurde im Mischverhältnis 2 : 1 wiederholt und über Nacht im Kühlschrank bei 4 C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Proben eine Stunde bei Raumtemperatur aufgewärmt. Das Gewebe wurde in eine Ausgussform platziert und mit einem Tropfen Epon-Einbett-Lösung versetzt. Die Lösung polymerisierte über fünf Stunden bei 60 C und härtete danach 48 Stunden bei 60 C aus. Es wurden Semidünnschnitte mit einer Dicke von 0,5 µm angefertigt und nach Richardson-Mallory gefärbt. Hierbei wurden Schnitte über mindestens 20 Minuten bei 80 C auf dem Heiztisch getrocknet. Die Farbstofflösung wurde mit einer Pipette tropfenweise aufgetragen und zwei Minuten gefärbt. Es folgten das Abspülen mit vorgewärmtem Aqua dest., die Trocknung auf dem Heiztisch und das Eindecken mit Eukitt. Es wurden Ultradünnschnitte mit einer Dicke von 0,1-0,2 µm angefertigt. Für den Kontrastiervorgang wurden jeweils drei Proben in eine Vertiefung einer Zellkulturschale gegeben. Pro Vertiefung wurden 300µl Uranylacetat für 20 Minuten hinzugefügt. Die Proben wurden erst mit 1000µl Methanol dreimal, danach mit 1000µl Aqua dest. zweimal gespült. 300µl Bleicitrat wurde für 20 Minuten hinzugefügt. Mit 500µl 0,5molarem NaOH wurde zweimal gespült. Danach wurde zweimal mit 1000µl Aqua dest. gespült und ein bis zwei Stunden bei 60 C getrocknet. Die Entwicklung der elektronenmikroskopischen Bilder erfolgte im Fotolabor (Knowles 1965) (Inomoto und Osamura, 2009).

4 Ergebnisse

4.1 Frequenz primärer NEC

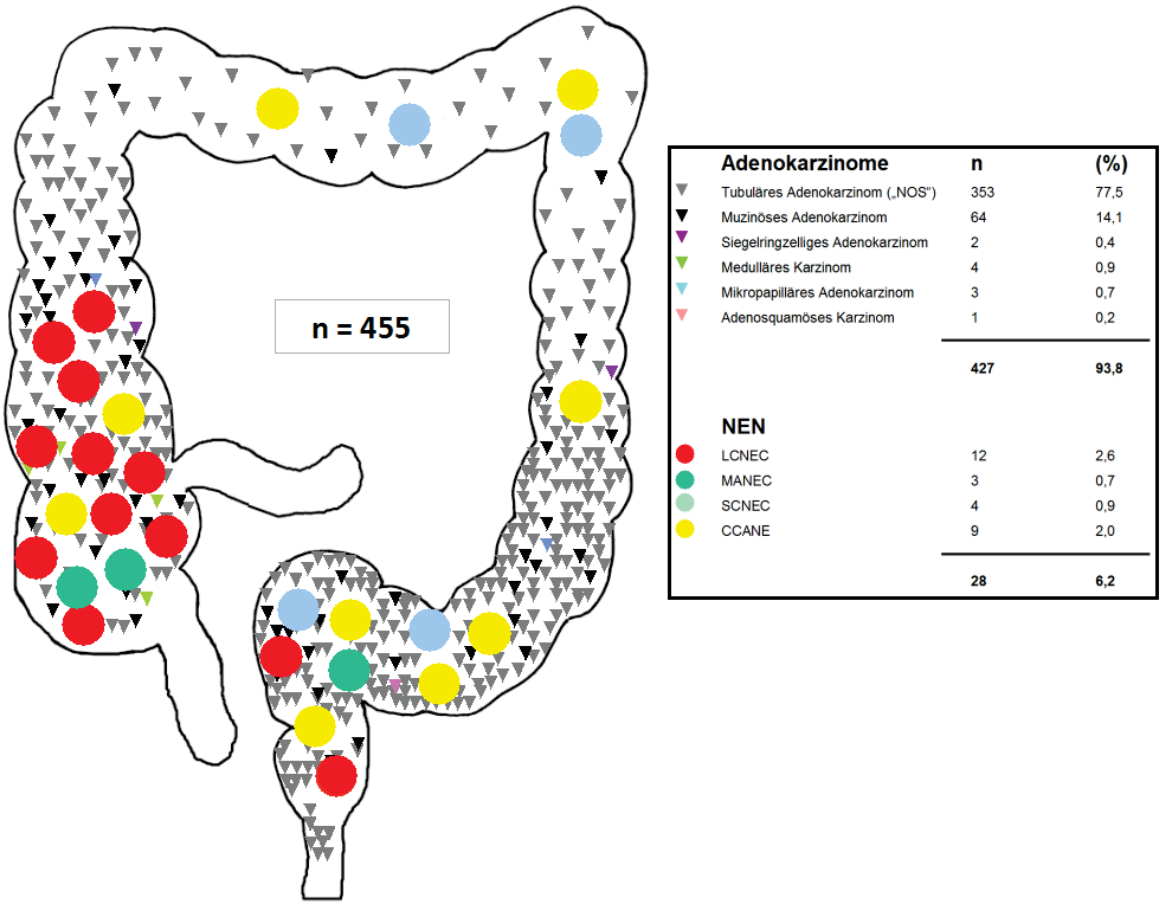
Es wurden insgesamt 455 Operationspräparate von Dickdarmkarzinomen reevaluiert. In diesem Kollektiv wurden 12 LCNEC, 4 SCNEC, 3 MANEC und 9 CCANE identifiziert (insgesamt 6 %; Abb. 2, Tabelle 11 und 12).

Die Anzahl der Diagnosen der unterschiedlichen Tumorentitäten ist nach einzelnen Jahren nachfolgend in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Anzahl der Diagnosen neuroendokriner Neoplasien im Untersuchungszeitraum

Jahr	LCNEC (n)	SCNEC (n)	MANEC (n)	CCANE (n)
2002	1	1	0	2
2003	2	1	0	3
2010	4	0	0	2
2011	5	2	3	2

CCANE cribriformes adenoneuroendokrines Karzinom, **LCNEC** großzelliges neuroendokrines Karzinom, **MANEC** gemischt adenoneuroendokrines Karzinom, **SCNEC** kleinzelliges neuroendokrines Karzinom.



Adenokarzinome	n	(%)
Tubuläres Adenokarzinom („NOS")	353	77,5
Muzinöses Adenokarzinom	64	14,1
Siegelringzelliges Adenokarzinom	2	0,4
Medulläres Karzinom	4	0,9
Mikropapilläres Adenokarzinom	3	0,7
Adenosquamöses Karzinom	1	0,2
	427	**93,8**
NEN		
LCNEC	12	2,6
MANEC	3	0,7
SCNEC	4	0,9
CCANE	9	2,0
	28	**6,2**

Abb. 2: Verteilung der Tumorentitäten in 455 Operationspräparaten.

CCANE cribriformes adenoneuroendokrines Karzinom, **LCNEC** großzelliges neuroendokrines Karzinom, **MANEC** gemischt adenoneuroendokrines Karzinom, **NEN** Neuroendokrine Neoplasien, **SCNEC** kleinzelliges neuroendokrines Karzinom.

NEN machen insgesamt 6,2% der untersuchten kolorektalen Karzinome aus. LCNEC treten vermehrt rechtskolisch auf, während konventionelle Adenokarzinome vornehmlich linkskolisch lokalisiert sind.

Tabelle 12: Epidemiologie, Lokalisation und Therapie von Patienten mit neuroendokrinen Neoplasien des Dickdarms

Nr.	Alter [Jahre]	Geschlecht	Lokalisation	Größe [cm]	Klinisches Follow up
LCNEC					
1	60	m	Zökum	5,5	k.A.
2	78	f	Zökum	10	Progress; palliative CT mit Xeloda
3	82	m	Zökum	5	k.A.
4	71	f	Rektosigmoid	11	Vollremission bis 2 Jahre nach OP.
5	90	m	Ascendens	3,5	Keine adjuvante CT aufgrund des Alters
6	71	m	Ascendens	6	Keine CT
7	80	f	Ascendens	7	Palliative CT, BSC
8	72	m	Ascendens	7	k.A.
9	74	m	Ascendens	3	Keine adjuvante CT wegen reduziertem Allgemeinzustand.
10	69	f	Zökum	6	Adjuvante CT mit FOLFOX 4
11	89	m	Zökum	8	BSC, keine CT
12	67	f	Zökum	5,3	CT (FOLFOX + 5-FU+ Oxaliplatin), Octreotid
MANEC					
13	81	f	Zökum	3,5	Bauchwandrezidiv nach 26 Monaten, adjuvante CT
14	56	m	Rektum	0,3	Vollremission zwei Jahre nach Operation
15	69	f	Zökum	8	CT mit Cisplatin und Etoposid
SCNEC					
16	65	f	Linke Flexur	17	Palliative CT, BSC
17	65	m	Rektum	9,5	Palliative CT, BSC
18	52	m	Transversum	7,5	palliative CT (Cisplatin, Etoposid), Vollremission bis sechs Monate nach OP
19	78	f	Rektum	6,5	k.A.
CCANE					
20	81	f	Zökum	4,2	Kein Follow up aufgrund des Alters
21	64	m	Rektum	4	Follow up in einem anderen Krankenhaus.
22	66	f	Rektum	3,2	Adjuvante CT, Vollremission neun Jahre nach OP
23	62	m	Sigma	3,5	Adjuvante CT (FOLFOX), Tod aufgrund der Tumorerkrankung drei Jahre nach OP
24	81	f	Linke Flexur	2,5	Adjuvante CT mit Capecitabine
25	65	m	Rektosigmoid	10,5	Palliative CT, BSC
26	81	f	Sigma	3	Palliative CT, BSC
27	57	m	Transversum	3,5	k.A.
28	70	m	Zökum	3,5	k.A.

BSC *best supportive care*, **CCANE** cribriformes adenoneuroendokrines Karzinom, **CT** Chemotherapie, **f** weiblich, **k.A.** keine Angaben, **LCNEC** großzelliges neuroendokrines Karzinom, **m** männlich, **MANEC** gemischt adenoneuroendokrines Karzinom, **OP** Operation, **SCNEC** kleinzelliges neuroendokrines Karzinom.

Tabelle 13: TNM-Klassifikation und Tumorstadium von Patienten mit neuroendokrinen Neoplasien des Dickdarms

Nr.	pT	pN		M	UICC Stadium
LCNEC					
1	pT4b	pN2b	(36/36)		IIIC
2	pT4a	pN1a	(1/20)		IIIB
3	pT4a	pN2b	(12/13)		IIIC
4	pT3	pN0	(0/17)		IIA
5	pT3	pN1a	(1/26)	M0	IIIB
6	pT4a	pN2b	(22/51)	pM1b (LYM, HEP)	IVB
7	pT4a	pN2b	(11/23)	pM1a (HEP)	IVA
8	pT4a	pN1b	(2/18)	pM1b (HEP, PER, PUL)	IVB
9	pT3	pN2b	(9/26)	pM1a (HEP)	IVA
10	pT3	pN1b	(2/25)	M0	IIIB
11	pT4a	pN2b	(11/15)	M1b (HEP, PER, PUL)	IVB
12	pT3	pN2b	(7/15)	M1b (HEP, PUL)	IVB
MANEC					
13	pT4b	pN1b	(2/33)		IIIC
14	pT1	pN0	(0/19)		I
15	pT3	pN2b	(17/31)	M1b (HEP, LYM, OSS)	IVB
SCNEC					
16	pT4b	pN0	(0/11)	M1a (LYM)	IVA
17	pT3	pN2b	(11/26)	M1b (PER, ADR, LYM)	IVB
18	pT3	pN2a	(6/26)	M1a (HEP)	IVA
19	pT3	pN0	(0/30)		IIA
CCANE					
20	pT4a	pN2b	(9/23)	M1a (HEP)	IVA
21	pT3	pN2b	(11/26)	M1a (HEP)	IVA
22	pT3	pN0	(0/14)	M0	IIA
23	pT3	pN1b	(3/15)	M1a (PER)	IVA
24	pT4a	pN1b	(3/19)	M0	IIIA
25	pT3	pN2a	(5/16)	M1b (HEP, PUL)	IVB
26	pT3	pN1a	(1/6)	M1b (HEP, PUL)	IVB
27	pT3	pN1a	(1/4)		IIB
28	pT3	pN2b	(8/14)		IIIC

ADR Nebennierenmetastasen, **CCANE** cribriformes adenoneuroendokrines Karzinom, **HEP** Lebermetastasen, **LCNEC** großzelliges neuroendokrines Karzinom, **LYM** nicht-lokoregionäre Lymphknotenmetastasen, **M** Fernmetastasierung, **m** männlich, **MANEC** gemischt adenoneuroendokrines Karzinom, **OSS** Knochenmetastasen, **pN** Nodalstatus, **pT** Tumorstadium, **PUL** Lungenmetastasen, **SCNEC** kleinzelliges neuroendokrines Karzinom.

4.2 Epidemiologie und klinische Pathologie von NEC

4.2.1 Patientenalter und Geschlecht

Die Daten zum Alter der Patienten sind in Tabelle 14 zusammengefasst und zusätzlich in Tabelle 12 dargestellt. Diese Daten zeigen, dass es sich um ältere Patienten handelte. SCNEC traten im Vergleich zu anderen NEN Entitäten im Durchschnitt sechs Jahre früher auf (Tabelle 12 und 14).

Tabelle 14: Patientenalter bei Operation einer neuroendokrinen Neoplasie

Tumorsubtyp	Mittelwert [Jahre]	Median [Jahre]	Spannbreite [Jahre]
LCNEC	75	73	60-90
SCNEC	65	65	52-78
MANEC	69	69	69-81
CCANE	70	66	57-81

CCANE cribriformes adenoneuroendokrines Karzinom, **LCNEC** großzelliges neuroendokrines Karzinom, **MANEC** gemischt adenoneuroendokrines Karzinom, **SCNEC** kleinzelliges neuroendokrines Karzinom.

Insgesamt zeigten LCNEC, CCANE und AC in unserem Kollektiv eine leichte Bevorzugung des männlichen Geschlechts, wobei das Verhältnis Männer: Frauen für LCNEC 1,4 : 1, für CCANE 1,3 : 1 und für AC 1,2 : 1 betrug (Tabelle 15). Bei sehr kleinen Fallzahlen ist das Geschlechterverhältnis bei SCNEC mit 1:1 ausgewogen. MANEC traten überwiegend bei Frauen auf mit einem Verhältnis von 3 : 1 (Tabelle 15).

Tabelle 15: Geschlechtsverteilung neuroendokriner Neoplasien

Tumorsubtyp	männlich	weiblich
LCNEC	7/12 (58 %)	5/12 (42 %)
SCNEC	2/4 (50 %)	2/4 (50 %)
MANEC	1/3 (33 %)	2/3 (67 %)
CCANE	5/9 (56 %)	4/9 (44 %)

CCANE cribriformes adenoneuroendokrines Karzinom, **LCNEC** großzelliges neuroendokrines Karzinom, **MANEC** gemischt adenoneuroendokrines Karzinom, **SCNEC** kleinzelliges neuroendokrines Karzinom.

4.2.2 Tumorlokalisation

In unserem Patientenkollektiv waren LCNEC häufiger im rechten Kolon lokalisiert (83 %, Abb. 2, Tabelle 12 und 16). Auch MANEC traten bei zwei unserer drei Patienten (67 %) rechtskolisch auf (Abb. 2, Tabelle 12 und 16). AC sowie SCNEC zeigten eine Präferenz für aborale Dickdarmabschnitte (Abb. 2, Tabelle 12 und 16).

Tabelle 16: Lokalisation neuroendokriner Neoplasien

Tumorsubtyp	Rechtes Kolon (Zökum bis rechte Flexur)	Kolon transversum	Linkes Kolon (linke Flexur bis Sigma) + Rektum
LCNEC	10/12 (83 %)		2/12 (17 %)
SCNEC		1/4 (25 %)	3/4 (75 %)
MANEC	2/3 (67 %)		1/3 (33 %)
CCANE	2/9 (22 %)	1/9 (11 %)	6/9 (67 %)

CCANE cribriformes adenoneuroendokrines Karzinom, **LCNEC** großzelliges neuroendokrines Karzinom, **MANEC** gemischt adenoneuroendokrines Karzinom, **SCNEC** kleinzelliges neuroendokrines Karzinom.

4.2.3 Tumorstadium der neuroendokrinen Karzinome

Unsere Analyse zeigte, dass Patienten mit LCNEC und SCNEC zum Zeitpunkt der Operation meist ein fortgeschrittenes Tumorstadium aufwiesen (Tabelle 13 und 17). Ein Großteil der Patienten wies zum Zeitpunkt der Erstdiagnose bereits Fernmetastasen auf, besonders in der Leber, aber auch in nicht-lokoregionären Lymphknoten, Lunge oder Peritoneum (Tabelle 13). Zusätzlich aufgeführt ist in Tabelle 12 die Art der durchgeführten operativen und medikamentösen Therapie.

Tabelle 17: Tumorstadien neuroendokriner Neoplasien

Tumorstadium	LCNEC	MANEC	SCNEC	CCANE
I			1/4 (25 %)	
II	1/12 (8 %)	1/3 (33 %)		2/9 (22 %)
III	5/12 (42 %)	1/3 (33 %)		2/9 (22 %)
IV	6/12 (50 %)	1/3 (33 %)	3/4 (75 %)	5/9 (56 %)

CCANE cribriformes adenoneuroendokrines Karzinom, **LCNEC** großzelliges neuroendokrines Karzinom, **MANEC** gemischt adenoneuroendokrines Karzinom, **SCNEC** kleinzelliges neuroendokrines Karzinom.

4.2.4 Histopathologie

LCNEC

Die in unserer Arbeit untersuchten LCNEC zeigten vielfach „Muster-in-Muster"-Architektur, d. h. oft fand man kleine, zu Rosetten zusammengelagerte Tumorzellkomplexe (Abb. 3, G), welche entweder zu größeren, soliden Verbänden (Abb. 3, E) oder cribriformen Strukturen mit komedoartigen Nekrosen konfluierten (Abb. 3, A+D). Ebenfalls häufig imponierten solide kohäsive Tumorverbände (Abb. 3, H). Im Bereich der Invasionsfront fanden sich oft diskohäsiv wachsende Karzinomzellen. Seltener traten tubuläre Strukturen auf, die dann an ein konventionelles Adenokarzinom erinnerten (Abb. 3, J). Die Tumorzellen wiesen

zytologisch große Kerne mit grobscholligem Chromatin und Makronukleolen sowie reichlich eosinophiles bis amphophiles Zytoplasma auf (Abb. 4, A).

MANEC

Von drei Patienten mit MANEC war ein Tumor vom amphikrinen Typ, d. h. jede Tumorzelle vereinigte neuroendokrine (Expression neuroendokriner Marker) und exokrine Charakteristika (Schleimbildung) auf sich (Abb. 5, G, H, I). Bei den zwei anderen Patienten bestand das MANEC jeweils aus einer histologisch abgrenzbaren exokrinen Komponente in Form eines Adenoms (70 % der Tumormasse einnehmend) und einer neuroendokrinen Komponente in Form eines LCNEC bzw. eines SCNEC (jeweils 30 % der Tumormasse einnehmend).

SCNEC

Die vier Patienten mit SCNEC zeigten ein solides Wachstumsmuster aus teils kohäsiv und, teils diskohäsiv wachsenden Tumorzellen (Abb. 4, B und Abb. 5, D-F). Zytologisch imponierten „nackte“ Tumorzellkerne mit schmalem Zytoplasmasaum, Mitosen und Apoptosen, Hyperchromasie und gegenseitigem Eindrücken der Kerne (*moulding*) (Abb. 4, B).

CCANE

Diese Tumorgruppe zeigte ein teils tubulär, teils cribriformes Wachstumsmuster mit zentralen Komedonekrosen ähnlich einem duktalen Carcinoma in situ der Mamma (Abb. 5, J-L). Zytologisch ähnelten die Tumoren einem konventionellen Adenokarzinom mit oft länglichen Kernen, grobscholligem Chromatin und gut sichtbaren Nukleolen.

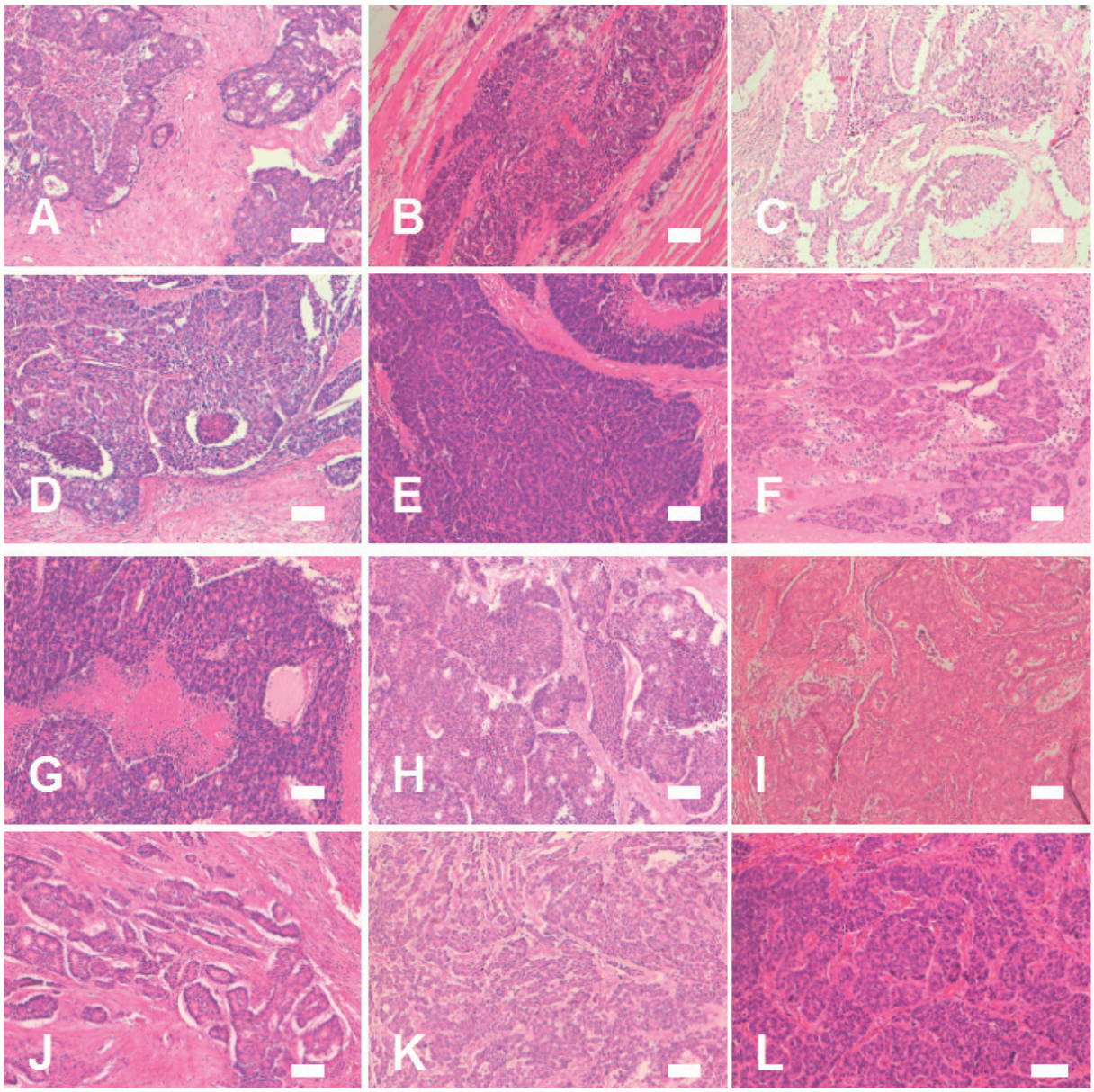


Abb. 3: Verschiedene Wachstumsmuster großzelliger neuroendokriner Karzinome (H&E, 100x)

Großzellige neuroendokrine Karzinome zeigten eine hohe Variabilität in Bezug auf ihr Wachstumsmuster. Oft imponierte ein „Muster-im-Muster“, d. h. kleine Tumorrosetten lagerten sich zu soliden (B, E, F, K, L) oder cribiformen (A, D, G, I) Strukturen zusammen, oft mit Komedonekrosen. Weiterhin fanden sich eine solide (C, H) oder eine tubuläre Architektur (J). Skalierung: 100 µm.

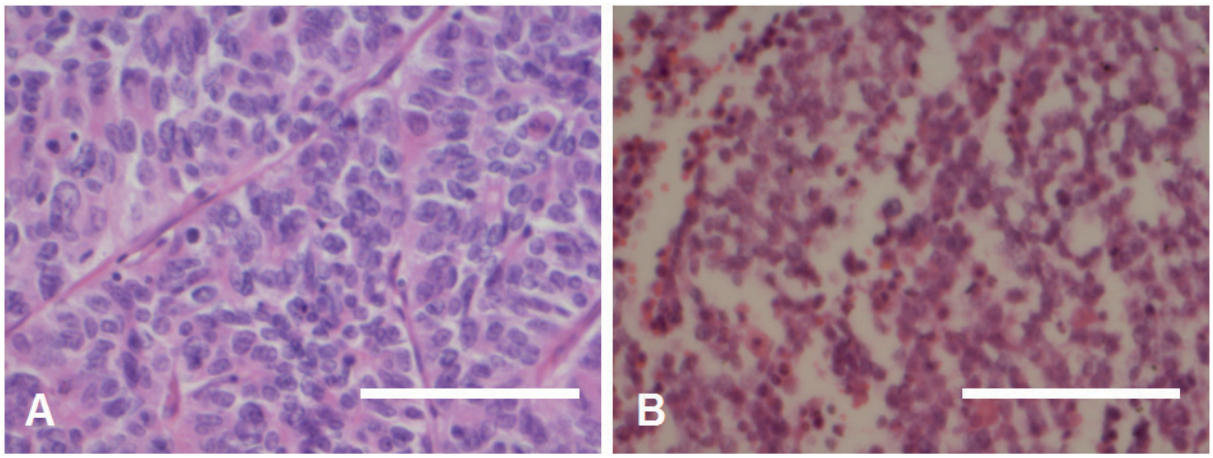


Abb. 4: Zytologie von großzelligen und kleinzelligen neuroendokrinen Karzinomen (H&E, 400x)

Großzellige neuroendokrine Karzinome (A) bestanden aus großvolumigen Zellen mit reichlich eosinophilem bis amphophilem Zytoplasma, grobscholligem Chromatin und gut sichtbaren Nukleolen. Kleinzellige neuroendokrine Karzinome (B) wiesen nackte Kerne, nukleäres *moulding* und homogenes Chromatin auf. Skalierung: 100 µm.

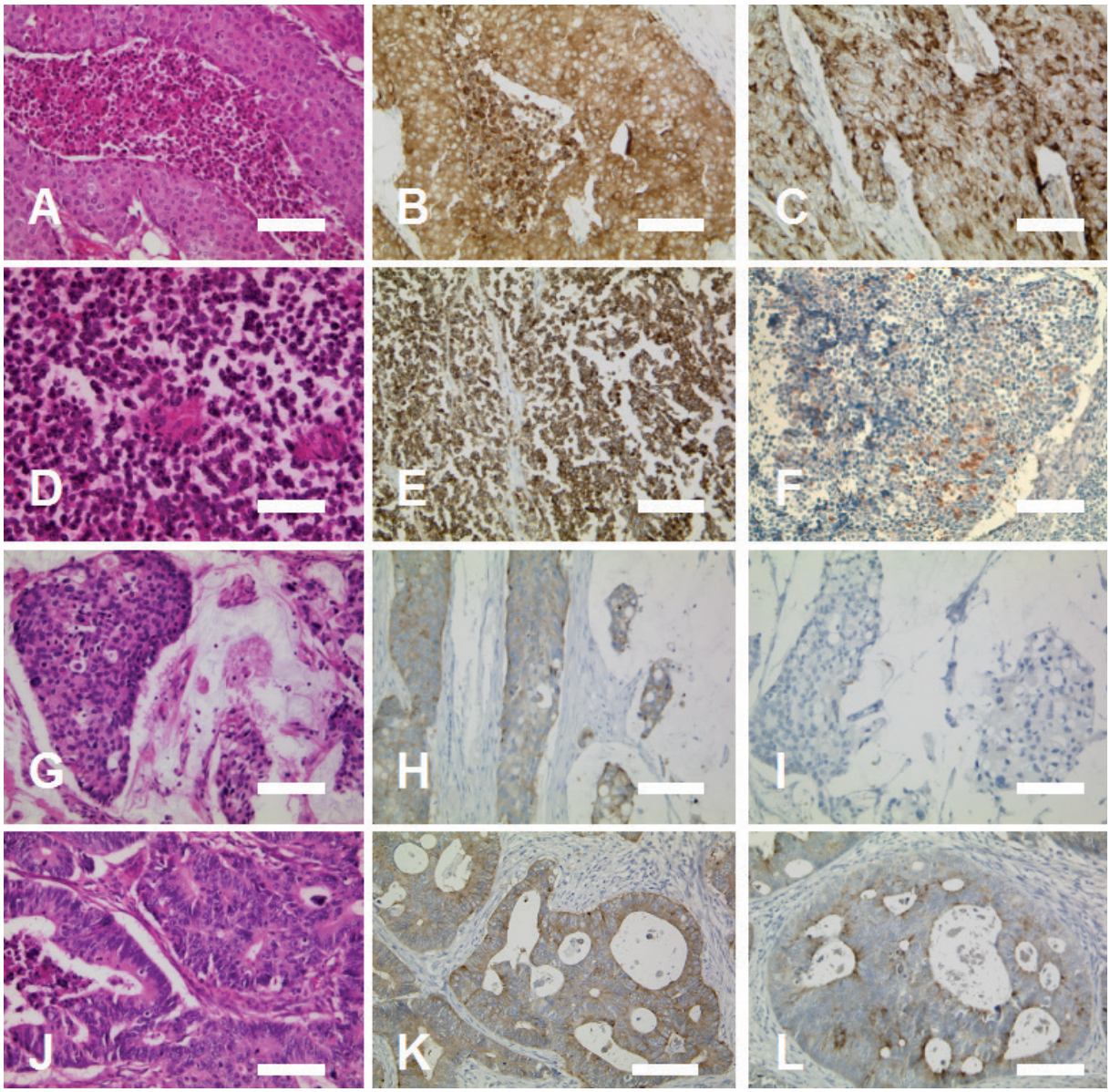


Abb. 5: Neuroendokrine Neoplasien mit Expression der spezifischen neuroendokrinen Marker Synaptophysin und Chromogranin A (200 x)

Die Expression neuroendokriner Marker in großzelligen neuroendokrinen Karzinomen (A-C), in kleinzelligen neuroendokrinen Karzinomen (D-F), in gemischt adeno-neuroendokrinen Karzinomen (G-I) und in cribriformen adeno-neuroendokrinen Karzinomen (J-L) wird veranschaulicht. Alle neuroendokrinen Neoplasien zeigten eine durchgängige, zumeist kräftige immunhistochemische Synaptophysin-Expression (B, E, H, K). Chromogranin A (C, F, I, L) wurde nur von einem Teil der Tumoren (schwach) exprimiert. Skalierung: 100 µm.

4.3 Hereditärer Hintergrund und funktionelle Aktivität

Bei sämtlichen NEC und MANEC ergaben sich keine Hinweise auf einen hereditären Hintergrund in Form einer Multiplen endokrinen Neoplasie (MEN), einer Familiären adenomatösen Polyposis (FAP) oder eines Hereditären kolorektalen Karzinoms ohne Polyposis (HNPCC). Die klinischen Symptome unterschieden sich nicht von konventionellen Adenokarzinomen. Eine Symptomatik durch einen Hormonexzess als Surrogatmarker für eine funktionelle Aktivität wurde nicht berichtet.

4.4 Immunhistochemische und molekularpathologische Analyse von NEC

Die Tabellen 18 und 19 fassen die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen zusammen. Der spezifische neuroendokrine Marker Synaptophysin wurde von 100 % der untersuchten LCNEC, MANEC und SCNEC exprimiert, wohingegen Chromogranin A nur in einem Teil dieser Tumoren nachweisbar war. Bei den CCANE hingegen erwies sich Chromogranin als der sensitivere Marker (Tabelle 18). VMAT 2 zeigte in wenigen LCNEC und CCANE eine schwache Expression (Tabelle 18). Der SSTR2A-Rezeptor wurde in einem Patienten mit LCNEC und in zwei SCNEC-Patienten überexprimiert (Tabelle 18). Der Ki-67-Proliferationsindex war konstant in allen Tumorentitäten hoch und erreichte bei den SCNEC Werte von >80 % (Tabelle 18). Pan-Zytokeratine wurden – außer in SCNEC – in allen Entitäten kräftig exprimiert, ähnlich durchgängig wie CK8 (Tabelle 19). Auch CK18, CK20 und CEA wurden in den meisten Tumoren kräftig exprimiert, mit Ausnahme eines SCNEC (Tabelle 19). Die Mehrzahl der LCNEC und alle CCANE exprimierten den kolischen Transkriptionsfaktor CDX2 (Tabelle 19). Keine der Neoplasien zeigte eine Expression von VMAT1, SSTR5, TTF-1 und nur eine inhomogene, schwache Expression von CK7 (Tabelle 19).

Tabelle 20 dokumentiert, dass ein Großteil der NEC p53 immunhistochemisch überexprimierte und mikrosatellitenstabil (MSS) war (Tabelle 20). Molekularpathologisch wiesen 58 % der LCNEC (n=7) eine V600E-BRAF-Mutation auf und 17 % (n=2) eine KRAS-Mutation in Codon 12 oder 13 (Tabelle 20). C-Kit-Mutationen in den Exonen 9 und 11 oder EGFR-Mutationen in den Exonen 18, 19 oder 21 wurden nicht detektiert (Tabelle 20).

Tabelle 18: Immunhistochemisches Markerprofil von neuroendokrinen Neoplasien des Dickdarms (Neuroendokrine Marker, Somatostatin-Rezeptoren, Proliferation)

	Neuroendokrine Marker				Somatostatin-Rezeptoren		Proliferation
	Syn	CgA	VMAT1	VMAT2	SSTR2A	SSTR5	Ki-67
LCNEC							
1	++	-	-	-	+	-	85 %
2	++	++	-	-	-	-	75 %
3	++	+	-	-	-	-	55 %
4	++	-	-	-	-	-	75 %
5	++	-	-	-	-	-	65 %
6	++	-	-	+	-	-	75 %
7	++	-	-	-	-	-	85 %
8	++	-	-	-	-		70 %
9	++	++	-	+	-	-	75 %
10	++	++	-	+	-	-	55 %
11	++	-	-	-	-	-	80 %
12	++	++	-	-	++	-	75 %
MANEC							
1	++	-	-	-	-	-	65 %
2	++	++	-		+	-	55 %
3	++	-	-	-	-	-	60 %
SCNEC							
1	++	++	-	-	++	-	90 %
2	++	-	-	-	-	-	85 %
3	++	-	-	-	-	-	85 %
4	++	-	-	-	++	-	85 %
CCANE							
1	+	++	-	+	+	-	75 %
2	+	++	-	-	-	-	75 %
3	++	++	-	+	-	-	75 %
4	++	++	-	-	-	-	80 %
5	+	++	-	-	-	-	70 %
6	-	++	-	-	-	-	70 %
7	++	++	-	-	-	-	75 %
8	++	++	-	-	+	-	75 %
9	++	++	-	+	-	-	45 %
10	-	++	-	+	-	-	50 %

- negativ, + schwache Expression oder Expression in <30 % der Tumorzellen, ++ mittelstarke oder kräftige Expression in >30 % der Tumorzellen.

CCANE cribriformes adenoneuroendokrines Karzinom, **CgA** Chromogranin A, **LCNEC** großzelliges neuroendokrines Karzinom, **MANEC** gemischt adenoneuroendokrines Karzinom, **SCNEC** kleinzelliges neuroendokrines Karzinom, **SSTR** Somatostatinrezeptor, **Syn** Synaptophysin, **VMAT** vesikulärer Monoamintransporter.

Tabelle 19: Immunhistochemisches Markerprofil von neuroendokrinen Neoplasien des Dickdarms (epitheliale Marker und Transkriptionsfaktoren)

	Zytokeratine / epitheliale Marker						Transkriptionsfaktoren		
	Pan-CK	**CK7**	**CK8**	**CK18**	**CK20**	**CEA**	**TTF-1**	**CDX2**	**islet-1**
LCNEC									
1	++	-	++	++	++	++	-	++	-
2	++	-	++	++	-	++	-	-	-
3	++	-	++	++	-	++	-	++	-
4	++	-	++	++	+	+	-	++	-
5	++	-	++	++	-	-	-	++	-
6	++	-	++	++	-	++	-	+	-
7	+	-	++	++	+	++	-	+	-
8	++	-	++	++	++	++	-	++	-
9	++	-	++	++	++	++	-	++	-
10	++	+	++	++	++	++	-	++	-
11	++	-	++	++	++	-	-	+	-
12	++	-	++	++	-	+	-	-	-
MANEC									
1	++	-	++	++	-	++	-	++	-
2	++	-	++	++	- (NEC)/ ++ (Ad)	- (NEC)/++ (Ad)	-	- (NEC)/ ++ (Ad)	-
3	++	-	++	++	- (NEC)/++ (Ad)	- (NEC)/++ (Ad)	-	- (NEC)/ ++ (Ad)	-
SCNEC									
1	-	-	-	-	-	-	-	-	+
2	-	-	+	-	++	-	-	-	++
3	++	-	++	++	-	-	-	-	-
4	++	-	++	++	-	-	-	-	-
CCANE									
1	++	-	++	++	++	++	-	++	-
2	++	-	++	++	-	++	-	++	-
3	++	+	++	++	++	++	-	++	-
4	++	-	++	++	++	++	-	++	-
5	++	-	++	-	+	++	-	++	-
6	++	+	++	++	++	++	-	++	-
7	++	-	++	++	++	++	-	++	-
8	++	+	++	++	-	++	-	++	-
9	++	-	++	-	+	++	-	++	-
10	++	-	++	++	++	++	-	++	-

- negativ, + schwache Expression oder Expression in <30 % der Tumorzellen, ++ mittelstarke oder kräftige Expression in >30 % der Tumorzellen.

Ad Adenom, **CCANE** cribriformes adenoneuroendokrines Karzinom, **CDX2** *caudal type homeobox 2,* **CEA** Carcinoembryonales Antigen, **CgA** Chromogranin A, **CK** Zytokeratin, **LCNEC** großzelliges neuroendokrines Karzinom, **MANEC** gemischt adenoneuroendokrines Karzinom, **NEC** Neuroendokrines Karzinom, **SCNEC** kleinzelliges neuroendokrines Karzinom, **Syn** Synaptophysin, **TTF** Thyroidaler Transkriptionsfaktor.

Tabelle 20: Auswertung therapeutisch und prognostisch relevanter molekularer Marker

	Immunhistochemie							Mutationsanalyse	
	p53	**MLH1**	**MSH2**	**PMS2**	**MSH6**	**β-Catenin**	**c-Kit**	**KRAS**	**BRAF**
LCNEC									
1	++	++	++	++	++	-	+	WT	Mut
2	-	++	++	++	++	-	+	WT	Mut
3	-	++	++	++	++	++	-	WT	Mut
4	++	-	++	-	++	++	-	WT	Mut
5	++	++	++	++	++	-	-	WT	Mut
6	++	++	++	++	++	++	+	WT	Mut
7	++	++	++	++	++	++	-	WT	Mut
8	++	++	++	++	++	-	-	WT	WT
9	+	++	++	++	++	++	-	WT	WT
10	++	++	++	++	++	++	-	WT	WT
11	++	++	++	++	++	++	-	Mut (Gly13Asp)	WT
12	++	++	++	++	++	+	-	Mut (Gly12Asp)	WT
MANEC									
13	++	++	++	++	++	+	-	WT	WT
14	++	+	+	+	+	++	-	WT	WT
15	++	++	++	++	++	++	-	Mut (Gly12 Val)	WT
SCNEC									
16	++	-	++	-	++	++	-	WT	WT
17	++	++	++	++	++	-	++	Mut (Gly12Val)	WT
18	++	++	++	++	++	+	-	WT	Mut
19	++	++	++	++	++	++	-	Mut (Gly12Ser)	WT
CCANE									
20	-	++	++	++	++	++	-	WT	WT
21	-	++	++	++	++	++	-	WT	WT
22	++	++	++	++	++	++	+	WT	WT
23	+	++	++	++	++	++	+	Mut (Gly13Asp)	WT
24	++	++	++	++	++	++	++	WT	WT
25	+	++	++	++	++	+	++	WT	WT
26	++	++	++	++	++	++	+	WT	WT
27	++	++	++	++	++	++	++	WT	WT
28	++	++	++	++	++	++	+	WT	WT

++ kräftige Expression in >50 % der Tumorzellen, + schwache Expression oder kräftige Expression in <50 % der Tumorzellen, – keine Färbereaktion.

Asp Asparaginsäure, **BRAF** Murines Sarcom virales Onkogen Homolog B1, **CCANE** cribriformes adenoneuroendokrines Karzinom, **c-Kit** Kit Protoonkogen Rezeptortyrosinkinase, **Gly** Glycin, **KRAS** Kirsten Rattensarkom virales Onkogen Homolog, **LCNEC** großzelliges neuroendokrines Karzinom, **MANEC** gemischtes adenoneuroendokrines Karzinom, **MLH1** MutL Homolog 1, **MSH2** MutS Homolog 2, **MSH6** MutS homolog 6, **Mut** Mutation, **p53** Tumorsuppressorprotein p53, **PMS2** PMS homolog 2, **SCNEC** kleinzelliges neuroendokrines Karzinom, **Ser** Serin**, Val** Valin, **WT** Wildtyp.

4.5 Etablierung und Charakterisierung von zwei NEC-Zelllinien

Zusammen mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Andreas Krieg (Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, UKD) wurden erstmals Zelllinien aus LCNEC etabliert, die aus dem gastroösophagealen Übergang („NEC-DUE1“) bzw. dem Kolon („NEC-DUE2“) stammen (Krieg et al., 2014). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Zelllinien elektronenmikroskopisch, immunhistochemisch und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie charakterisiert.

NEC-DUE1 wurde aus der Lebermetastase eines LCNEC des gastroösophagealen Übergangs, NEC-DUE2 aus der Lymphknotenmetastase eines LCNEC der rechten Kolonflexur isoliert. Beide Tumoren wiesen zytologische Charakteristika eines großzelligen NEC auf.

Die Elektronenmikroskopie zeigte das Vorhandensein elektronendichter Granula (sog. *dense core granules*) (Abb. 6) bei negativer Kontrolle (Zelllinie HCT 116). Die Immunhistochemie dokumentierte unter anderem eine Expression des spezifischen Markers Synaptophysin, zahlreicher niedrig-molekularer Zytokeratine (CK8, CK18) und die Expression des kolischen Transkriptionsfaktors CDX2 (Abb. 8). Die konfokale Laserscanning Mikroskopie zeigte eine zytoplasmatische Kolokalisation der neuroendokrinen Marker Synaptophysin und Chromogranin A (Abb. 7).

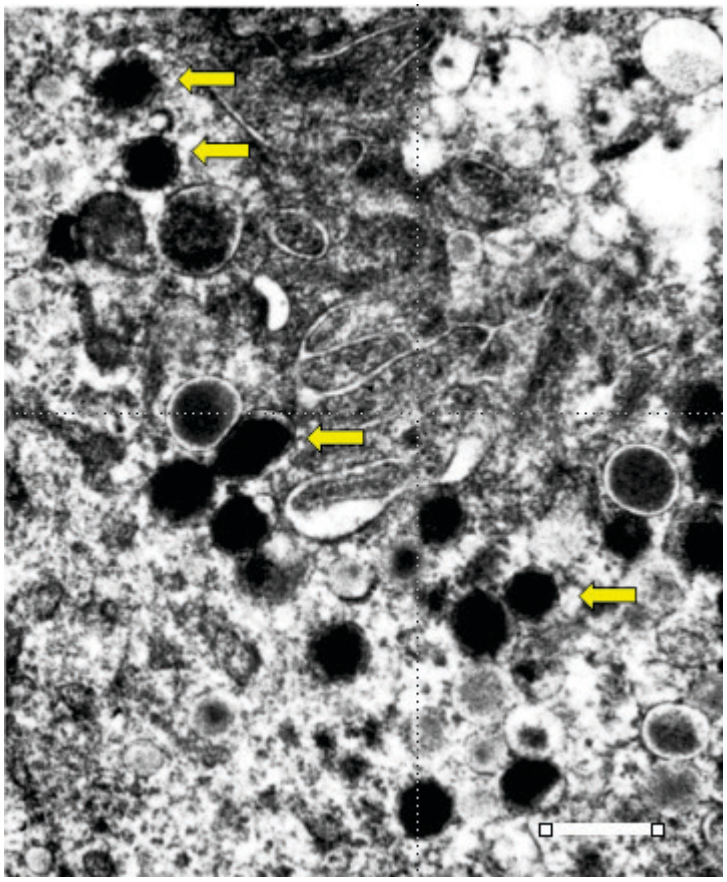


Abb. 6: Elektronenmikroskopie der LCNEC Zelllinie NEC-DUE2

In der neuroendokrinen Zelllinie sind elektronendichte neurosekretorische Granula nachweisbar (Pfeile). Skalierung: 500 nm.

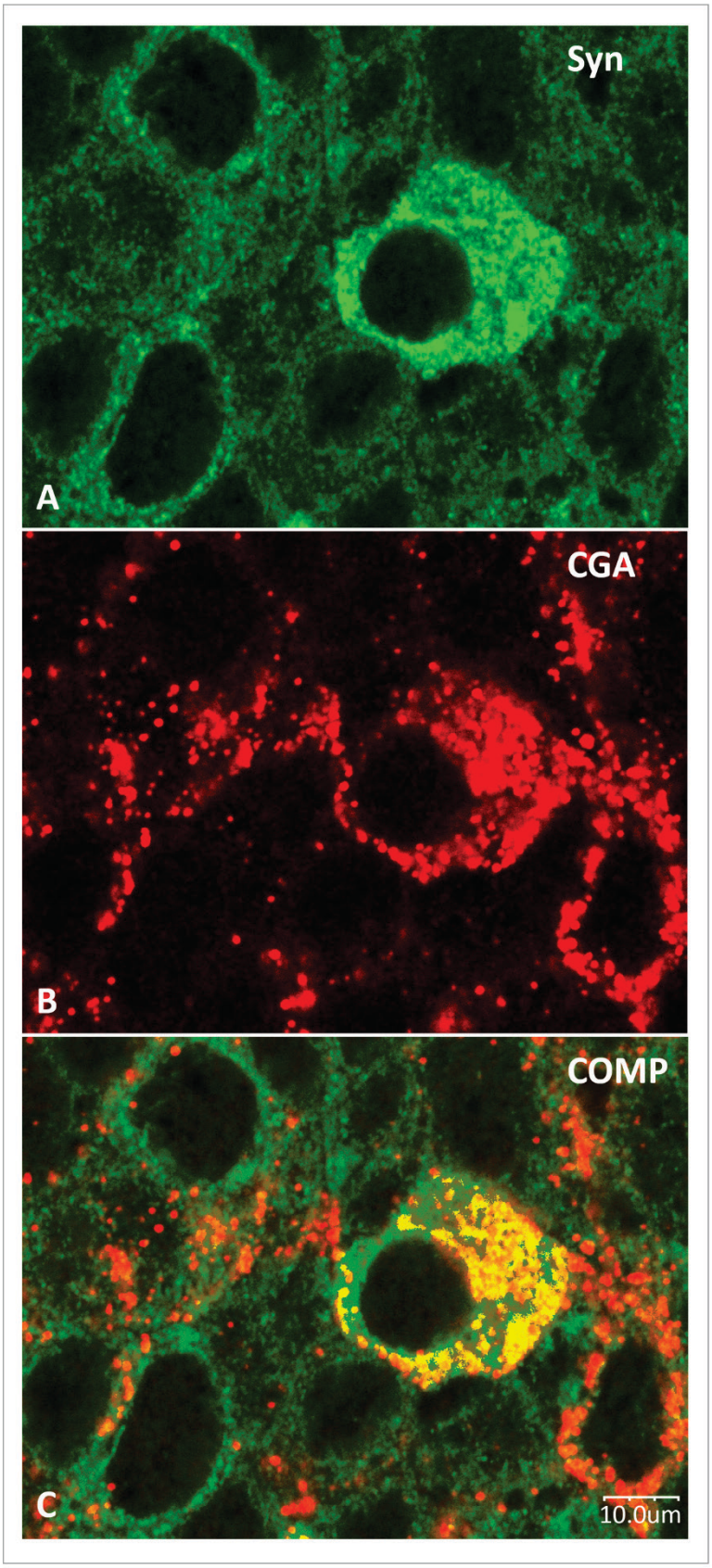


Abb. 7: Konfokale Laser Scanning Mikroskopie der Zelllinie NEC-DUE2

Die neuroendokrinen Marker Synaptophysin (SYN, A) und Chromogranin A (CGA, B) werden in den Tumorzellen koexprimiert (COMP, C).

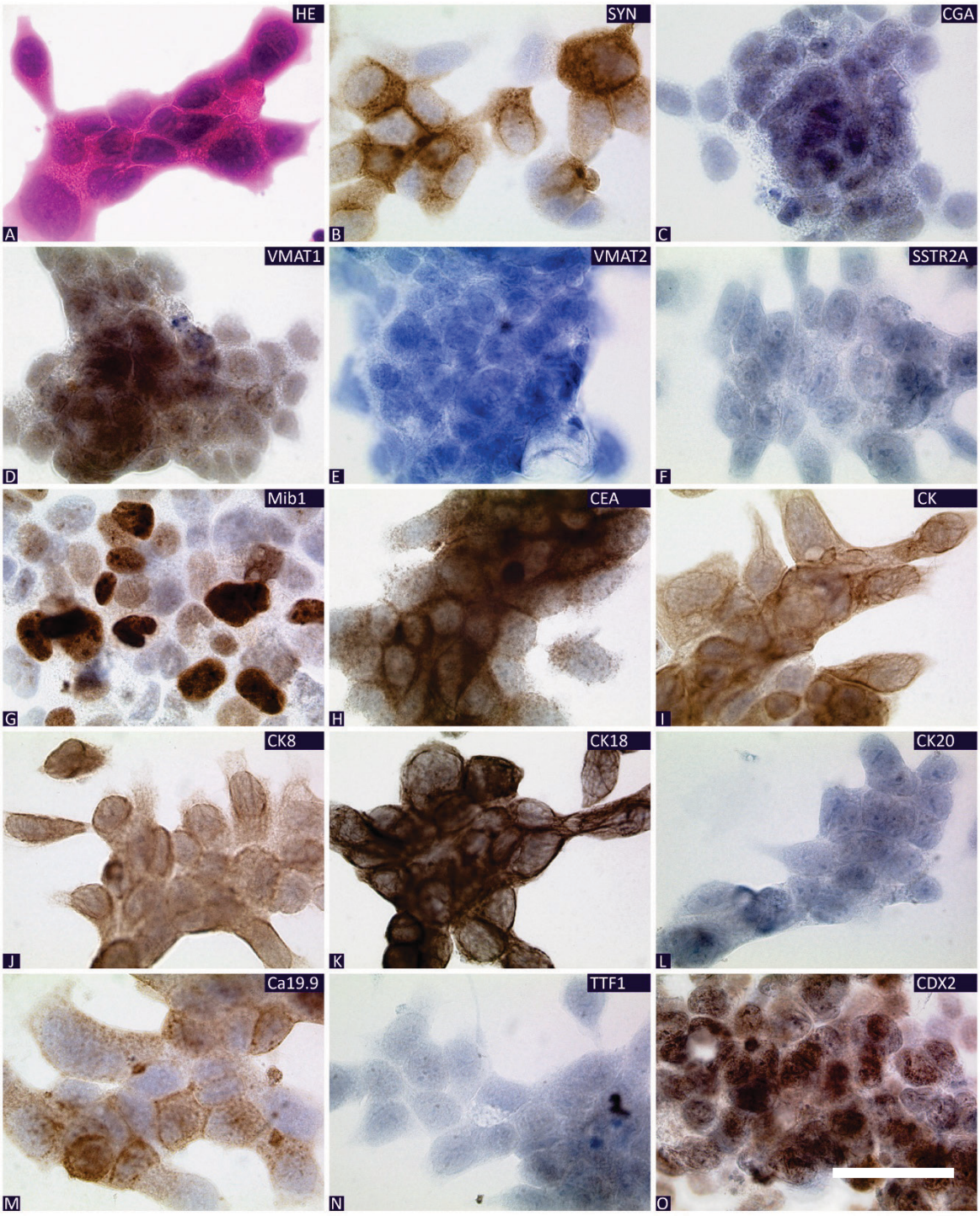


Abb. 8: Immunhistochemische Charakterisierung der Zellinie NEC-DUE2 (400x)

Ca19.9 Carbohydrat-Antigen 19.9, **CDX2** *caudal type homeobox 2*, **CEA** Carcinoembryonales Antigen, **CgA** Chromogranin A, **CK** Zytokeratin, **SSTR** Somatostatinrezeptor, **SYN** Synaptophysin, **TTF1** Thyroidaler Transkriptionsfaktor 1, **VMAT** vesikulärer Monoamintransporter.

Diese Zelllinie ist charakterisiert durch eine neuroendokrine Zytologie (A), zart granuläre zytoplasmatische Positivität für Synaptophysin (B), Negativität für Chromogranin A (C), zytoplasmatisch granuläre Positivität für den VMAT1 (D), Negativität für VMAT2 (E) und SSTR2A (E), einen Mib-1-Proliferationsindex von 50 % (G), eine kräftige membranäre Expression von CEA (H), Pan-Zytokeratin (I), CK8 (J), CK18 (K) und Ca19.9 (M). Negativität für CK20 (L), TTF1 (N) und kräftige nukleäre Expression von CDX2 (O). Skalierung. 100 µm.

5 Diskussion

5.1 Frequenz primärer NEC

Unsere Analyse dokumentierte eine Häufigkeit von 4,2 % NEC an den von uns untersuchten KRK des Dickdarms (2,6 % LCNEC, 0,9 % SCNEC und 0,7 % MANEC). Die Häufigkeit von NEC lag damit höher als in der Literatur bislang publiziert (0,2 % – maximal 2 %) (Kang et al., 2007) (Staren et al., 1988) (Bernick et al., 2004) (Ilett et al, 2015) (Kojima et al., 2016).

Die von uns dokumentierte höhere Prävalenz der LCNEC basiert mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auf der systematischen Reevaluation in Kenntnis und unter stringenter Anwendung der diagnostischen Kriterien der aktualisierten WHO-Klassifikation (Carneiro F et al. (Hrsg.), 2010) (Klöppel, 2017), einschließlich der systematischen immunhistochemischen Aufarbeitung des Tumorgewebes mit den neuroendokrinen Markern Chromogranin A und Synaptophysin. Die bislang angenommene Prädominanz SCNEC gegenüber LCNEC (Conte et al., 2016) (Bernick et al., 2004) konnten wir im Kolorektum nicht bestätigen. Bislang wurde davon ausgegangen, dass es sich bei LCNEC um Raritäten handelt (Hammond et al., 2016). Unsere Studie hingegen zeigt, dass LCNEC im Kolon deutlich gegenüber SCNEC überwiegen. Es ist somit zu vermuten, dass LCNEC bislang unterdiagnostiziert wurden. Diese Hypothese wird untermauert durch eine umfangreiche Studie an Gastrektomiepräparaten (Jiang et al., 2006).

Immer wieder trat die Schwierigkeit bei der genauen Bestimmung der Häufigkeit von LCNEC aufgrund unpräziser Nomenklatur auf: In einer Arbeit von Pizzi (Pizzi et al., 2003) wurden insgesamt neun kolorektale „gering differenzierte endokrine Karzinome“ untersucht, wobei es bei mindestens drei der Tumoren mit einem Ki-67 ≤25 % äußerst unwahrscheinlich war, dass es sich um NEC handelte. In einer Studie von Zhang et al. (Zhang et al., 2016) wurden 49 Patienten mit KRK NEC untersucht: Es wurde zwischen „hochdifferenzierten NEC“, „intermediären NEC“ und Kleinzellern unterschieden. In einer Arbeit von Kojima et al. (Kojima et al., 2016) wurde bei 760 untersuchten kolorektalen NEN ein Anteil von 3,9 % „NET, G3“ angegeben, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um NEC, G3 handelte.

Eine weitere Fehlerquelle bei der NEC-Diagnostik birgt das Tumorsampling. Es konnte gezeigt werden, dass die Adenokarzinom-Komponente v.a. in den inneren

Wandschichten anzutreffen ist, während die neuroendokrine Komponente sich vor allem in peripheren Wandabschnitten findet. Die präoperative Diagnose eines NEC wurde in einer Studie nur in 60 % der Patienten gestellt (Bernick et al., 2004). Da viele Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits synchrone Metastasen aufweisen, wird z. T. auf eine chirurgische Resektion verzichtet und die Diagnose wird auf Grundlage superfizieller Tumorbiopsien gestellt. Auch andere Autoren (Karkouche et al., 2012) schätzen die Gefahr einer Unterdiagnose von NEC hoch ein.
Schlussfolgernd ist im Kontext der revidierten WHO-Klassifikation und deren konsequenten Anwendung mit einer steigenden Frequenz von LCNEC des Dickdarms zu rechnen. Wahrscheinlich wird die Entität bislang unterdiagnostiziert. In früheren Studien wurde die Prävalenz von NEC meist mithilfe retrospektiver Literaturrecherchen ermittelt. Durch das systematische von uns durchgeführte immunhistochemische Screening wurden auch NEC erfasst, die initial als Adenokarzinom fehldiagnostiziert wurden.

5.2 Epidemiologie und klinische Pathologie von NEC

5.2.1 Patientenalter und Geschlecht

Unsere Analyse dokumentiert für LCNEC ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis, jedoch ein höheres Lebensalter als bislang publiziert (Mittelwert: 75 Jahre, Spannbreite: 60–90 Jahre). Patienten mit SCNEC wiesen ein Lebensalter von durchschnittlich 65 Jahren auf (Spannbreite: 52–78 Jahre).
Die Mehrheit der Patienten mit kolorektalem NEC wurden in der Literatur zwischen dem 60. und dem 70. Lebensjahr diagnostiziert, wobei beide Geschlechter gleich häufig betroffen waren (Kang et al., 2007) (Pizzi et al., 2003) (Akintola-Ogunremi et al., 2003) (Gaffey et al., 1990) (Smith et al., 2014) (Vortmeyer et al., 1997).
Aufgrund der geringen Fallzahl ist unsere Analyse möglicherweise nicht repräsentativ. Die Vermutung liegt dennoch nahe, dass in vorangegangenen Studien überwiegend SCNEC untersucht wurden.

5.2.2 Tumorlokalisation

Unsere Arbeit dokumentiert eine deutlich höhere Prävalenz von LCNEC und MANEC rechtskolisch. Konventionelle Adenokarzinome und SCNEC traten hingegen bevorzugt linkskolisch auf.

Die Beobachtung einer Bevorzugung des rechten Kolons korrespondierte mit den Befunden früherer Studien. Die bisher hierzu vorliegende Datenlage war aufgrund der kleinen Fallzahl und der nicht präzisen Unterscheidung zwischen LCNEC und SCNEC nur eingeschränkt verwertbar (Gaffey et al., 1990) (La Rosa et al., 2012) (Smith et al., 2014) (Zhang et al., 2016).
Zusammenfassend ist bei konsequenter Anwendung der WHO-Klassifikation und deren diagnostischen Kriterien mit einem deutlich höheren Auftreten von LCNEC und MANEC im rechten Kolon auszugehen.

5.2.3 Tumorstadium

Unsere Studie zeigte, dass Patienten mit NEC bei Diagnosestellung meist ein bereits fortgeschrittenes Tumorstadium aufwiesen. 50 % der LCNEC wurden im Stadium IV nach UICC diagnostiziert. Die Metastasierung betraf in erster Linie die Leber, aber auch nicht-lokoregionäre Lymphknoten, Peritoneum und Lunge.
In der SEER-Datenbank wurden Fernmetastasen bei Diagnosestellung bei 62 % der Patienten beschrieben (Kang et al., 2007). Die Leber war der Hauptmetastasierungsort für gastrointestinale NEC (Kang et al., 2007) (Pizzi et al., 2003). In einer Studie mit 49 Patienten mit kolorektalen NEC zeigten 28,6 % bei Erstdiagnose eine Fernmetastasierung (Zhang et al., 2016). Interessanterweise wurden anorektale NEC in einem früheren Stadium diagnostiziert, während kolische NEC oft im Stadium IV entdeckt wurden, was v.a. auf eine frühere Symptomatik in Form eines peranalen Blutabgangs zurückzuführen war. Einfluss auf die Prognose hatte diese Tatsache jedoch nicht. Wir konnten zeigen, dass bei den meisten der LCNEC-Patienten (11/12; 92 %) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose eine Lymphknoten- und/ oder Lebermetastasierung vorlag. Diese Beobachtungen sind im Einklang mit der Literatur (Gaffey et al., 1990) (La Rosa et al., 2012) (Smith et al., 2014) (Mills et al., 1983). Lymphknoten- und Fernmetastasierung waren ein häufiges Ereignis bei Patienten mit LCNEC, wobei kritisch anzumerken ist, dass die meisten Studien ausschließlich Kleinzeller untersuchten bzw. keine Differenzierung zwischen groß- und kleinzelligen NEC erfolgte (Kang et al., 2007) (Haider et al., 2006) (Li et al., 2010) (Pizzi et al., 2003) (Gaffey et al., 1990) (La Rosa et al., 2012) (Smith et al., 2014) (Vortmeyer et al., 1997). Unsere Analyse bestätigte die – bislang an sehr kleine Fallserien vorliegende – Beobachtung, dass es sich bei den primären NEC des Dickdarms um hochaggressive

Neoplasien handelte, welche bei Erstdiagnose bereits als systemische Tumorerkrankung vorlagen.

5.2.4 Histologische Charakteristika

Während SCNEC aufgrund ihrer typischen histomorphologischen Merkmale unabhängig vom Organsystem einen hohen Wiedererkennungswert haben, zeigen LCNEC eine außerordentliche histologische Bandbreite an Wuchsformen. Wir dokumentierten in unserer Arbeit ein breites Spektrum an histologischen Mustern, z. B. rosettenartige, tubuläre, nestförmige und solide Wachstumsmuster, sowie cribriforme Architektur mit Nekrosen (Abb. 3). Oft fand sich in einem NEC innerhalb des Tumors eine Vermischung der verschiedenen Architekturformen mit Ausbildung einer Sekundärarchitektur („Muster-in-Muster“) (Abb. 3).

Somit korrespondierten die Befunde zu den in der WHO-Klassifikation aufgeführten gängigen Wachstumsformen im Kolon (Carneiro et al. (Hrsg.), 2010). In anderen Organsystemen wurden zusätzliche Wuchsformen beschrieben. So beschrieb Jiang et al. an LCNEC des Magens (Jiang et al., 2006) neben solider, tubulärer und rosettenartiger auch eine szirrhöse Architektur. In der Studie wiesen mehr als die Hälfte der Tumoren eine Muzinbildung auf, möglicherweise als Indikator für eine bidirektionale Differenzierung. Im Pankreas wurden zusätzlich papilläre und pseudopapilläre Formen aufgeführt (Basturk et al., 2014). Die organoiden, nestartigen, trabekulären, rosettenartigen oder palisadenförmigen Wuchsformen führten in früheren Arbeiten zu einer verwirrenden Terminologie für LCNEC als „intermediärzellige Varianten“, „hochdifferenziertes neuroendokrines Karzinom“ (Saclarides et al., 1994) oder „mäßiggradig differenziertes neuroendokrines Karzinom“ (Gaffey et al., 1990). Als NEC wurden sowohl hoch, als auch niedrig differenzierte Tumoren bezeichnet und z. T. auch als G2 graduiert (Wick et al., 2005).

Zusammengefasst stellten LCNEC eine differenzialdiagnostische Herausforderung für den Pathologen dar, da die unterschiedlichen Wachstumsmuster ein gewöhnliches Adenokarzinom, G3 imitieren konnten. Der großzügige Einsatz von Immunhistochemie war für die Diagnosestellung zwingend.

5.3 Hereditärer Hintergrund und funktionelle Aktivität

Bei keinem der in unserer Studie eingeschlossenen Patienten lag ein hereditäres Tumorsyndrom oder eine chronisch entzündliche Darmerkrankung vor. Ausnahmslos

wurden die Patienten durch das lokal fortgeschrittene oder metastasierte Tumorleiden klinisch apparent. Eine Symptomatik durch einen Hormonexzess wurde nicht berichtet. Träger von Keimbahnmutationen sind prädisponiert für die Entwicklung kolorektaler Karzinome (S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“, 2017). So kommt es bei Patienten mit einer FAP in 100 % zu einer Karzinom-Entwicklung durch Mutationen im APC-Gen. Bei HNPCC besteht durch Mutationen in Mismatch-repair-Genen ein deutlich erhöhtes KRK-Risiko (S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“, 2017). Erkrankungen, die mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten von NEN einhergehen sind beispielsweise Syndrome der multiplen endokrinen Neoplasien (MEN-1 und MEN-2) (Hyde et al., 2017). In keinem unserer Patienten konnte ein hereditäres Tumorsyndrom dokumentiert werden. Diese Beobachtung korrespondiert auch mit dem hohen Lebensalter. Die oben genannten Syndrome manifestieren sich meist in deutlich jüngerem Lebensalter (S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“, 2017) (Gaztambide et al., 2013) (Lakhani et al., 2007).

Wir konnten für keinen der untersuchten Patienten unseres Kollektivs ein endokrinologisch relevantes Syndrom als Folge einer unkontrollierten, exzessiven Hormonsekretion nachweisen. In Einklang mit der Literatur ergaben sich folgerichtig klinischerseits selten Hinweise auf die neuroendokrine Natur des Tumors (Garcia-Carbonero et al., 2016), da keine Hormon-Produktion stattfand (Rindi et al, 1996). NEC können durchaus im Einzelfall Peptid- oder Amin-Hormone synthetisieren, speichern und stimulusunabhängig sezernieren, was zu entsprechenden endokrinen Symptomen führen kann (Grabowski et al, 2002) (Vergeli-Rojas et al., 2013). Allerdings tritt eine neuroendokrine Symptomatik in NEC-Patienten nur außerordentlich selten auf und ist dann mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium assoziiert (Massironi et al., 2008).

Insofern unterstützten die Ergebnisse unserer Studie die bislang vorliegende Datenlage, wonach kolorektale NEC weder mit einem hereditären Tumorsyndrom noch mit einer hormonellen Aktivität assoziiert sind.

5.4 Immunhistochemische und molekularpathologische Analyse von NEC

5.4.1 Immunhistochemie

5.4.1.1 Generelle neuroendokrine Marker

Unsere Studie dokumentierte die Expression des neuroendokrinen Markers Synaptophsin in 100 % der LCNEC, SCNEC und der neuroendokrinen Komponente der MANEC. Chromogranin A wird in 42 % (5/12) der LCNEC, 33 % (1/3) der MANEC und 25 % (1/4) der SCNEC exprimiert. 25 % (3/12) der LCNEC zeigten eine schwache oder herdförmige Expression von VMAT 2.

Gemäß der WHO-Klassifikation 2010 (Carneiro et al. (Hrsg.), 2010) müssen sich für die Bezeichnung GEP-NEC per definitionem >30 % der Tumorzellen positiv für einen spezifischen neuroendokrinen Marker (Synaptophysin oder Chromogranin A) immunhistochemisch anfärben. Dies steht im Gegensatz zu gemischten Neoplasien z. B. der Lunge, wo lediglich >10 % neuroendokrin differenzierte Tumorzellen gefordert sind (Travis et al. (Hrsg.), 2015). Unsere Arbeit ist in Einklang mit der Literatur, wonach Synaptophysin – eine der Hauptbestandteile von zytoplasmatischen Mikrovesikeln – ein sensitiver genereller neuroendokriner Marker für NEC ist (Uccella et al., 2018). Chromogranin A – obwohl noch spezifischer – variiert mit der Dichte von sekretorischen Granula in Tumorzellen und ist somit deutlich schwächer oder fehlt gar, da NEC nur wenige sekretorische Granula enthalten (Uccella et al., 2018) (Ilett et al., 2015). Die vesikulären Monoamintransporter VMAT 1 und VMAT 2 wurden in zahlreichen GEP-NET gut untersucht (Jakobsen et al., 2001), wohingegen Daten bei NEC fehlen. Unsere Arbeit zeigte in 25 % (3/12) der LCNEC eine schwache oder fokale Expression von VMAT 2, die auch auf RNA-Ebene abgebildet wird (siehe Diskussion 5.5, Abb. 9).

Zusammenfassend unterstreichen unsere Daten: (1) Synaptophysin ist der spezifische neuroendokrine Marker für die Diagnostik von NEC mit der höchsten Sensitivität (2) VMAT2 wird fokal von einer Subgruppe kolorektaler LCNEC exprimiert, eignet sich jedoch nicht als Screeningmarker.

5.4.1.2 Transkriptionsfaktoren und Zytokeratine

In unserer Studie wurde in keinem der NEC eine TTF-1-Expression nachgewiesen, obwohl in der Literatur Prozentzahlen von 21 %-53% aller GEP-NEC als TTF-1-positiv

ausgewiesen wurden. Hierbei handelte es sich jedoch ausschließlich um SCNEC (Li et al., 2010) (Cheuk et al., 2001) (Ordóñez, 2000). 83 % der LCNEC zeigten eine CDX2-Expression (10/12 Patienten). Obwohl gemäß den ENETS-Leitlinien (Garcia-Cabonero et al., 2016) die Expression von Transkriptionsfaktoren bei NEC nur eingeschränkt einsetzbar ist, verdeutlicht unsere Beobachtung einer Expression von CDX-2 (bei fehlendem Nachweis von TTF-1), dass es sich in unserer Studie nicht um metastasierte bronchopulmonale NEC handelte, sondern um einen intestinalen Primarius. Dies korrespondierte zu den uns vorliegenden klinisch-bildgebenden Daten. In keinem der Patienten bestand ein Hinweis auf einen extra-intestinalen metastasierten Primarius (insbesondere kein Merkelzell-Karzinom). Das Expressionsprofil der beiden Transkriptionsfaktoren scheint somit nicht nur für die Diagnostik von NET, sondern auch bei NEC im Hinblick auf den Primarius zu diskriminieren.

In unserer Studie zeigten immerhin 60 % der LCNEC eine CK-20-Expression, aber nur 25 % der SCNEC. CK7 wurde fokal in einem LCNEC sowie fokal in 30 % der CCANE exprimiert. In einer Arbeit von Ordóñez (Ordóñez, 2000) fand sich im Vergleich zu konventionellen KRK ein geringerer Anteil CK20-positiver Karzinome, hier wurden allerdings vornehmlich SCNEC analysiert. Eine CK20-Expression wurde nur in einem NEC gefunden, wobei nicht ausgewiesen wurde, ob es sich dabei um ein LCNEC oder ein SCNEC handelte. Auch CK7 wurde in Übereinstimmung mit unseren Daten nur in einer kleinen Tumorfraktion gefunden. Anhand des TTF- und CDX2-Expressionsprofils wurde eine Einteilung in „*lung type NEC*“ (TTF1+/CDX2-), „*intestinal type NEC*“ (TTF1-/CDX2+), „*mixed type NEC*“ (TTF1+/CDX2+) und „*null type NEC*“ (TTF1-/CDX2-) vorgeschlagen. Hier konnten immerhin 90 % der LCNEC dem intestinalen Phänotyp zugeordnet werden, verglichen mit nur 45 % bei nicht-großzelligen NEC. Insofern stützt dies unsere Beobachtungen.

In einer Arbeit von Barbareske (Barbareschi et al., 2004) wurden 51 PDNEN untersucht. Hierbei konnte CDX2 auch in NEC anderer Organsysteme nachgewiesen werden (z. B. Harnblase, Lunge, Mamma). Bei hochdifferenzierten NEN wurde seine Bedeutung als Differenzierungsmarker bezüglich des Primärtumors herausgestellt, auch wenn hochdifferenzierte NET des Pankreas eine schwache CDX2-Expression aufwiesen. Es gilt also die analoge Einschränkung zur Lunge. Man vermutete als Ursache eine komplexe deregulierte Expression von Homöobox-Genen in NEC

(Abate-Shen, 2002). In einer Arbeit von La Rosa wurde CDX2 nur in 11 % der GEP-NEC nachgewiesen (La Rosa et al., 2012).
In unserer Studie sahen wir, dass LCNEC im Vergleich zu SCNEC mehr Zytokeratine exprimieren (CK8/18/20). Eine Arbeit konnte an LCNEC der Lunge ebenfalls häufiger eine Expression von CK7 und CK18 und zusätzlich vermehrt Zelladhäsionsmoleküle (beta-Catenin, E-Cadherin) im Vergleich zu SCNEC nachweisen (Nitadori et al., 2006). Bezüglich beta-Catenin sahen wir bei unserer Arbeit – bei kleiner Fallzahl – keine Unterschiede zwischen SCNEC und LCNEC.
Schlussfolgernd deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die Transkriptionsfaktoren TTF1 und CDX2 bei LCNEC durchaus eine Diskriminierung in Bezug auf den Primärtumor erlauben. Das Paradigma, wonach Transkriptionsfaktoren bei NEC nicht zur Suche des Primarius herangezogen werden können, lässt sich nur für SCNEC aufrechterhalten. Bei LCNEC werden – analog zu den Adenokarzinomen des Dickdarms – der intestinale Transkriptionsfaktor CDX2 sowie das intestinale Zytokeratin CK20 exprimiert und können diagnostisch genutzt werden.

5.4.1.3 SSTR2A

Wir fanden in 17 % (2/12) der LCNEC und in 50 % (2/4) der SCNEC eine SSTRA-Rezeptorexpression. Eine SSTR5-Expression wurde in keinem der von uns untersuchten Tumoren immunhistochemisch nachgewiesen.
Eine systematische SSTR2A-Rezeptor-Analyse von high grade NEC gibt es unseres Wissens bislang nicht. Die SSTR2A-Rezeptorexpression gilt im Allgemeinen als invers korrelierend zu der Proliferationsaktivität von NEN (Kaemmerer et al., 2015). Diesen Zusammenhang konnten wir anhand unserer Daten nicht herausarbeiten: Die SSTR2A-positiven Tumoren wiesen keine niedrigeren Proliferationsindizes auf. Es konnte gezeigt werden, dass eine Fraktion von G3-Tumoren kräftig nuklearmedizinisch SSTR-positiv ist und auf eine PRRT ansprechen (Ezziddin et al., 2006) (Ezziddin et al., 2011). Jedoch handelte es sich hierbei um Neoplasien mit einer Proliferationsfraktion von 30-40 %, die retrospektiv möglicherweise als NET G3 einzuordnen waren. Die meisten G3-Tumoren sprachen nicht auf eine PRRT an, trotz Akkumulation des Tracers (Ezziddin et al., 2006). Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass es Escape-Mechanismen gibt, die G3-Tumoren unempfindlich gegen das Radionukleotid machen (Ezziddin et al., 2006).

Zusammenfassend wies unsere Arbeit nach, dass eine Subpopulation von NEC ein abortives Immunolabelling für SSTR2A aufweist. Möglicherweise ist ein Bruchteil dieser Tumoren empfänglich für eine PRRT.

5.4.1.4 Ki-67

Wir sahen in unserer Arbeit bei LCNEC Proliferationsindizes von 50-90 %, die meisten LCNEC hatten jedoch einen Ki-67-Proliferationsindex von 60-80 %. Die SCNEC zeigten höhere Proliferationsindizes von 80-90 %.

Die herausragende prognostische Aussagekraft des Ki-67-Proliferationsindex für NEN ist mittlerweile allgemein anerkannt (Klöppel, 2017) (Carneira et al. (Hrsg.), 2010). Eine der umfangreichsten Studien zu gastrointestinalen G3-NEN ist die NORDIC-NEC-Studie (Sorbye et al., 2013) mit 252 eingeschlossenen Patienten. In der Studie wurde belegt, dass NEC mit einem Ki-67-Proliferationsindex von >55% ein besseres Ansprechen auf eine Platin-basierte Chemotherapie und ein schlechteres Überleben aufwiesen als NEN mit geringen Proliferationsindizes (20-55 %). Korrespondierend zu unseren Ergebnissen wurde der durchschnittliche Ki-67-Proliferationsindex in ösophagealen, rektalen oder kolischen NEC mit 67-80 % angegeben.

In den letzten Jahren wurde es deshalb zum Konsens, dass aufgrund von Morphologie, Proliferationsindex und dem molekularen Profil eine Unterscheidung zwischen NET, G3 und NEC sinnvoll ist (Milione et al., 2017) (Tang et al., 2016) (Basturk et al., 2015) (Heetfeld et al., 2015) (Vélayoudom-Céphise et al., 2013) (Uccella et al., 2018). Diese Tumoren waren prognostisch ungünstiger als G2-NET, aber günstiger als NEC und zeigten im Gegensatz zu letzteren ein besseres Ansprechen auf Somatostatinanaloga. Diese Unterscheidung fand deshalb Eingang in die aktuelle ENETS-Leitlinie (Garcia-Carbonero et al., 2016) und wurde von unserer Arbeit – im Vergleich zu vorangegangenen Studien – auch abgebildet. In Einklang mit der Literatur (Klöppel, 2017) fanden auch wir eine höhere Proliferationsaktivität in SCNEC.

Zusammenfassend konnten wir herausarbeiten, dass die meisten LCNEC einen Proliferationsindex von 60-80 % aufwiesen, damit sicher NEC und keine NET sind. Ihr Proliferationsindex lag unter dem von SCNEC.

5.4.2 Molekularpathologische Targets

Kolorektale Karzinome sind keine homogene Tumorgruppe, sondern entstehen über verschiedene molekulare Signalwege (Raskov et al., 2014) (Mathonnet et al., 2014). Kolorektale NEC und konventionelle Adenokarzinome zeigen hierbei eine Überlappung in Bezug auf molekulare Signalwege, die sich deutlich von der hochdifferenzierter NET unterscheidet (Uccella et al., 2018). Wir untersuchten in unserer Arbeit die klinisch und zellbiologisch besonders interessanten Proteine p53, BRAF, KRAS, c-Kit, EGFR und Her2/neu.

5.4.2.1 P53

Wir konnten in unserer Arbeit zeigen, dass 75 % (9/12) der LCNEC, 100 % (3/3) der MANEC, 100 % (4/4) der SCNEC sowie 55 % (5/9) der CCANE (55 %) eine kräftige p53-Überexpression aufweisen.

P53 ist ein Transkriptionsfaktor welcher auf zellulären Stress hin aktiviert wird und den Zellzyklus bzw. Apoptose reguliert. Das p53 Protein gilt als Tumorsuppressorprotein. Mutationen des p53 Proteins gehen mit Funktionsverlust und in den meisten Fällen einer verlängerten Halbwertszeit und konsekutiver Überexpression im Zellkern einher, die immunhistochemisch nachweisbar ist (Pizzi et al., 2003) (Li et al., 2006) (La Rosa et al., 2012) (Vortmeyer et al., 1997). P53 ist in ca. 43 % aller KRKs mutiert, meist spät in der Tumorgenese und bei prognostisch somit ungünstigen Neoplasien (Petitjean et al., 2007) (Iacopetta, 2003). Art und Lokalisation der p53-Mutation auf dem p53-Gen sind in unterschiedlichen Kolonabschnitten unterschiedlich (Jernvall et al., 1997) (Børresen-Dale et al., 1998). Im Gegensatz zu gewöhnlichen Adenokarzinomen des Dickdarms konnte für PDNEC gezeigt werden, dass hier p53-Alterationen ein frühes Ereignis in der Karzinogenese sind, und zwar unabhängig von der Tumorlokalisation (Furlan et al., 2005). Es wurde für PDNEC ein hohes Maß an Inaktivierung der p53-Signalwege gefunden (Pizzi et al., 2003). P53 wird physiologischerweise am stärksten durch Hypoxie induziert und es ist sehr wahrscheinlich, dass Zellen ohne p53 einen Selektionsvorteil in einer sauerstoffarmen Umgebung genießen. Der Nekrosereichtum der PDNEC, den wir auch in unseren Tumoren sahen, deutet auf eine intratumorale Hypoxie hin, die sowohl die starke Selektion hin zu p53-defizienten Tumorzellklonen bedingt als auch das invasive und metastatische Potenzial dieser Tumoren (Pennacchietti et al., 2003). Unabhängig von der anatomischen Lokalisation werden p53-Mutationen häufig in NEC gefunden (Dacic et al., 2002) (Furlan et al., 2005).

Zahlreiche Studien über GI-NEN und pulmonale NEN konnten eine signifikante Assoziation zwischen p53-Überexpression und biologischer Aggressivität herausarbeiten (Przygodzki et al., 1996) (Cheng et al., 1996) (Moyana et al., 2000). Gleiches ließ sich auch aus unseren Daten ersehen. Eine inverse Korrelation zwischen p53-Überexpression und einer Mikrosatelliteninstabilität, wie sie in einigen Arbeiten gezeigt wurde (Calistri et al., 2005) (Samowitz et al., 2002), konnten wir jedoch nicht bestätigen: Ein LCNEC-Patient mit p53-Überexpression zeigte einen Ausfall der MMR-Proteine MLH-1 und PMS-2 als Surrogatmarker für eine Mikrosatelliteninstabilität.
Zusammenfassend bestätigten unsere Daten die aktuelle Quellenlage, wonach eine immunhistochemische p53-Überexpression ein häufiges Ereignis in NEC ist. Ob die p53-negativen LCNEC keine Mutation aufwiesen oder ob eine inaktivierende Mutation vorlag, die zu einer fehlenden nukleären p53-Stabilisierung führte (Scardoni et al., 2014), müsste eine TP53-Mutationsanalyse zeigen.

5.4.2.2 Mikrosatelliteninstabilität

In unserer Studie konnten wir sowohl einen LCNEC als auch einen SCNEC mit Ausfall von MLH1 und PMS2 als Surrogatmarker für eine MSI detektieren. Das LCNEC zeigte ein niedriges Tumorstadium nach UICC ohne Nachweis von Lymphknoten- oder Fernmetastasen sowie eine Vollremission nach zwei Jahren.
MSI ist in NEC kein häufiges Ereignis: Analog zu unseren Zahlen zeigte eine Arbeit von Olevian (Olevian et al., 2016) in 93 % der NEC keine MSI. In einer Arbeit von Arnold (Arnold et al., 2008) wurden 28 kolorektale neuroendokrine Karzinome untersucht (ohne Differenzierung zwischen klein- und großzellig), keiner der Tumoren war MSI-H.
Eine Untergruppe kolorektaler NEC mit MSI und ausgeprägter genetischer Hypermethylierung weist eine bessere Prognose auf als NEC ohne diese Veränderungen (La Rosa et al., 2012) und es wurde deshalb vorgeschlagen MSI – analog zu kolorektalen Adenokarzinomen – als prognostischen Marker für eine günstigere Prognose einzusetzen (La Rosa et al., 2012) (Sahnane et al., 2015). Analog zu unseren Befunden wurde MSI in GEP-NEC insgesamt nur selten beobachtet (Ghimenti et al., 1999) (Stelow et al, 2006) (La Rosa et al., 2012).
Für SCNEC kann eine Assoziation zwischen MSI-H-Phänotyp mit einer günstigen Prognose in unserem (kleinen) Kollektiv nicht abgeleitet werden – unser Patient wurde in einem fortgeschrittenen Tumorstadium operiert. In einer Studie von Stelow (Stelow et al., 2006) an 15 SCNEC des Kolorektums wies kein Tumor einen MSI-Phänotyp auf.

In einer Arbeit von Sahnane et al. (Sahnane et al., 2015) wurden 37 NEC des Kolorektums analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass der hauptverantwortliche pathogenetische Mechanismus, welcher zu MSI in GEP-NEC/MANEC führt die methylierungsvermittelte Abschaltung des MLH-1-Gens ist. Der MSI-Status konnte gemäß dieser Arbeit morphologisch nicht vermutet werden, auch wir sahen in unseren MSI-H-Patienten keine spezifischen Charakteristika wie beispielsweise vermehrt tumorinfiltrierende Lymphozyten oder ähnliches.

Wir konnten anhand unserer Daten keine valide Aussage hinsichtlich therapeutischer Implikationen machen, da bei dem MSI-H-LCNEC keine Angabe zu einer erfolgten Chemotherapie vorlag und der MSI-H-SCNEC in palliativer Intention einer Chemotherapie unterzogen wurde. Ob NEC-Patienten mit MSI ein besseres Ansprechen auf Irinotecan aufweisen, wie es für Patienten mit konventionellen MSI-H-Adenokarzinomen gezeigt wurde (Bras-Gonçalves et al, 2000), bei vermindertem Ansprechen auf 5-Fluoruracil und Oxaliplatin (Zaanan et al., 2010), bleibt somit abzuwarten.

Schlussfolgernd konnten wir in unserer Arbeit zeigen, dass MSI in NEC selten vorkommt und möglicherweise mit einer besseren Prognose assoziiert ist.

5.4.2.3 KRAS

In unserer Arbeit sahen wir in 16 % der LCNEC, in 25 % der MANEC und in 50 % der SCNEC KRAS-Mutationen. Die Häufigkeit in LCNEC liegt also unter der von konventionellen Adenokarzinomen. Passend hierzu fanden sich vermehrt BRAF-Mutationen (siehe 5.4.2.4). BRAF- und KRAS-Mutationen schließen sich gegenseitig aus (Vaughn et al., 2011) (Simi et al., 2008), weil KRAS BRAF im MAPK-Signalweg vorgeschaltet ist.

Mutationen des KRAS-Gens werden als Biomarker verwendet, um bei Patienten mit metastasiertem KRK ein Ansprechen auf eine anti-EGFR-Therapie mit monoklonalen Antikörpern vorherzusagen (Karapetis et al., 2008). Die Häufigkeit von KRAS-Mutationen wird mit ca. 40 % aller konventioneller KRK angegeben (Hall und Kudchadkar, 2014). Patienten mit einer KRAS-Mutation profitieren nicht von einer Therapie mit anti-EGFR-Antikörpern wie Cetuximab oder Panitumumab (Blanke et al., 2011).

In einer Arbeit von Kleist (Kleist et al., 2014) wurden 115 KRK auf die Expression neuroendokriner Marker untersucht und das Verhältnis zum Mutationsstatus von KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA/TP53 untersucht. Die Mutationsraten in dieser Arbeit

unterschieden sich kaum von denen konventioneller Adenokarzinome ohne neuroendokrine Differenzierung: Es fanden sich KRAS-Mutationen in 50 %, BRAF-Mutationen in 11 %, NRAS-Mutationen in 5 %, PIK3CA-Mutationen in 8 % und TP53-Mutationen in 13 %. Die Arbeit differenzierte jedoch nicht zwischen den NEC-Subgruppen, was das unterschiedliche Ergebnis erklärt. In einer japanischen Serie (Takizawa et al., 2015) wurden KRAS-Mutationen in Codon 12 und 13 in 8,3 % (2/24) NEC gefunden, davon 1/9 SCNEC und 1/15 LCNEC. Eine Münchner Arbeitsgruppe (Woischke et al., 2017) untersuchte zehn MANEC und fünf NEC und fand sogar 60 % (9/15) KRAS-Mutationen. Von den mutierten NEC waren drei SCNEC und sechs LCNEC. Andere Studien fanden KRAS-Mutationen in 16 % (5/32) (Olevian et al., 2016), 25 % (2/8) (Jesinghaus et al., 2017), 30 % (3/9) (Vijavergia et al., 2016) und 35 % (13/37) (Sahnane et al., 2015).

Schlussfolgernd zeigt unsere Analyse, dass KRAS-Mutationen in NEC vorkommen, jedoch seltener als in konventionellen kolorektalen Adenokarzinomen. Bei keinem der eingeschlossenen Patienten wurde eine anti-EGFR-Therapie durchgeführt, sodass keine Aussage getroffen werden kann, inwiefern die Patienten auf eine Antikörpertherapie ansprechen oder ob Resistenzmechanismen greifen (Blanke et al., 2011).

5.4.2.4 BRAF

Unsere Arbeit zeigte V600E-BRAF-Mutationen in 58 % (7/12) der LCNEC und 25 % (1/4) der SCNEC. MANEC und CCANE wiesen einen BRAF-Wildtyp auf. Diese Ergebnisse konnten in anderen Studien z. T. bestätigt werden.

Mutationen des BRAF-Onkogens, v.a. auf dem Lokus V600E, kommen in 10-15 % der KRK vor (Rajagopalan et al., 2002) (Davies et al., 2002). Die V600E-BRAF-Mutation ist mit einer Bandbreite von zellulären Phänotypen assoziiert: Apoptose-Resistenz, genetische Instabilität, Alterung sowie Unabhängigkeit von extrazellulären Wachstumssignalen (Hirschi et al., 2014).

In einer Arbeit von Klempner (Klempner et al., 2016) ließen sich in 9 % von 109 fortgeschrittenen NEC BRAF-Mutationen nachweisen, allerdings ohne Differenzierung zwischen LCNEC und SCNEC. In einer Arbeit von Karkouche (Karkouche et al., 2012) wurden 12 kolorektale NEC und MANEC in Bezug auf KRAS und BRAF molekular charakterisiert. Die Frequenz von BRAF/KRAS-Mutationen zusammen wurde mit 60 % angegeben. Hier fanden sich allerdings nur in zwei MANEC BRAF-Mutationen. In einer Arbeit von Olevian (Olevian et al., 2016) wurden 32 schlecht differenzierte kolorektale

NEC charakterisiert. NEC hatten signifikant häufiger BRAF-Mutationen im Vergleich zu konventionellen Adenokarzinomen (60 % vs. 5 %), dafür seltener KRAS-Mutationen in den Codons 12 und 13 (17 % vs. 43 %). Weitere Studien zeigten einen hohen Prozentsatz von LCNEC mit BRAF-Mutationen, die mit einer Cyclin-D1-Überexpression vergesellschaftet waren (Saridaki et al., 2010).

In Bezug auf prognostische und therapeutische Implikationen existieren bislang in Bezug auf NEC kaum Daten. In konventionellen KRK waren BRAF-Mutationen in mikrosatellitenstabilen Tumoren prinzipiell mit einem höheren Tumorstadium und einem schlechteren Überleben vergesellschaftet (Samowitz et al., 2005) (Li et al., 2006) (Kakar et al., 2008) (Saridaki et al., 2010) und zeigten eine Resistenz gegenüber alleiniger BRAF-Inhibition (Prahallad et al., 2012). BRAF-Mutationen korrelierten hier mit Resistenz gegen den anti-EGFR-monoklonalen Antikörper Cetuximab (Di Nicolantonio et al., 2008) (Souglakos et al., 2009). Jedoch konnte die Resistenz in vitro durch Kombination mit dem BRAF-Inhibitor Sorafenib wieder aufgehoben werden (Di Nicolantonio et al., 2008). In einem Fallbericht (Capalbo et al., 2014) zeigte die Kombination eines EGFR-Inhibitors (Panitumumab) mit einem BRAF-Inhibitor (Vemurafenib) eine gute Verträglichkeit bei guter Tumorkontrolle. Ob dieser Umstand eine starke Rationale für die Kombination von Vemurafenib und anti-EGFR-Antikörpern in BRAF-mutierten NEC liefert, bedarf weiterer Studien. In einer neuen Arbeit wurden BRAF-Mutationen in 41,2 % (7/17) der untersuchten kolorektalen NEC nachgewiesen (Dizdar et al., 2018). Zusätzlich konnte eine BRAF-Inhibition sowohl in vitro an einer NEC-Zelllinie als auch am Maus-Modell mit Dabrafenib demonstriert werden (Dizdar et al., 2018).

Schlussfolgernd zeigten unsere Ergebnisse, dass BRAF-Mutationen ein häufiges Ereignis in LCNEC darstellen. Ob eine Kombinationstherapie mit anti-EGFR- und anti-BRAF-Antikörpern eine Erfolg versprechende Behandlungsoption für LCNEC darstellt – wie Einzelfallberichte nahelegen – müssen weitere klinische Studien zeigen.

5.4.2.5 c-Kit

Wir beobachteten in 25 % der LCNEC eine schwache sowie in 25 % der SCNEC eine kräftige immunhistochemische c-Kit-Überexpression. Dies war in Übereinstimmung mit anderen Studien (La Rosa et al., 2012). Unsere Daten legten jedoch nahe, dass die Überexpression nicht von einer aktivierenden Mutation herrührte und somit auch kein Ansprechen auf eine Glivec-Therapie zu erwarten wäre.

Das c-Kit-Protoonkogen kodiert für einen transmembranären Tyrosinkinase-Rezeptor (CD117). Bei den meisten gastrointestinalen Stromatumoren spricht eine immunhistochemische c-Kit-Expression für eine Mutation im c-Kit-Gen, dies konnte für kolorektale NEC nicht bestätigt werden (Akintola-Ogunremi et al., 2003). Die Koexpression von c-Kit und Stammzellfaktoren wurde in mehreren humanen Kolonkarzinomzelllinien gefunden und eine Aktivierung des c-Kit-Signalwegs scheint Tumorzellwachstum und Invasion zu fördern (Attoub et al., 2002) (Bellone et al. 2001) (Gavert et al., 2013). Es wurde vermutet (Akintola-Ogunremie et al., 2003), dass eine c-Kit-Überexpression in NEC eine molekulare Abnormität ist, die im Rahmen der Tumorprogression auftritt, da sie bei benachbarten Adenomen/ exokrinen Adenokarzinomen fehlt. Einige Arbeiten fanden jedoch ein kürzeres Überleben bei c-Kit-Mutation (Micke et al., 2003) (La Rosa et al., 2012) (Knösel et al., 2012), andere keine Überlebensunterschiede (Akintola-Ogunremi et al., 2003). Die Studien bezogen sich jedoch entweder auf Kleinzeller (Micke et al., 2003), auf NET (Knösel et al., 2012) oder ganz allgemein auf NEC ohne weitere Differenzierung (La Rosa et al., 2012). In einer Arbeit von Akintola-Ogunremi wurden 30 „mäßiggradig differenzierte neuroendokrine Karzinome“ auf eine immunhistochemische c-Kit-Expression untersucht und immerhin die Hälfte zeigte eine Färbereaktion. Diese Ergebnisse wurden von einer anderen Arbeit bestätigt (Ishikubo et al., 2006). Wir sahen in unserer Studie weniger häufig eine immunhistochemische c-Kit-Färbung (jeweils 25 % bei LCNEC und SCNEC, keine in MANEC). Tumoren mit c-Kit-Expression unterschieden sich in unserer Studie in Bezug auf das Tumorstadium nicht von Karzinomen ohne c-Kit-Expression. Eine Studie von Ishikubo demonstrierte, dass von den 26 % der GEP-NEC mit c-Kit-Überexpression keines eine Mutation in den Exonen 9–13 aufwies – dem Hotspot der c-Kit-Mutation in gastrointestinalen Stromatumoren, der ein Ansprechen auf Tyrosinkinaseinhibitoren wahrscheinlich macht. Korrespondieren dazu wurde keine Wirksamkeit einer Glivec-Therapie in c-Kit-positiven NEN bewiesen (Gross et al., 2006). Auch in unserer Studie zeigte keiner der Tumoren eine c-Kit-Mutation in den Exonen 9 und 11.

Zusammenfassend ergab sich aus unserer Studie: (1) Tyrosinkinaseinhibitoren wären bei kolorektalen NEC keine therapeutische Option, da keine c-Kit-Mutation vorlag. (2) Das Vorhandensein einer immunhistochemischen c-Kit-Expression war in kolorektalen NEC kein seltenes Ereignis, erlaubte aber keine Rückschlüsse in Bezug auf Tumorstadium oder Aggressivität des Tumors.

5.4.2.6 HER2/ EGFR

In unserer Arbeit konnten wir bei keinem der insgesamt 28 untersuchten NEN eine HER2/neu-Überexpression oder eine EGFR-Mutation auf den Exonen 19, 20 und 21 nachweisen.

Unsere Ergebnisse wurden unterstrichen durch die Studie von Iyoda an NEC der Lunge (Iyoda et al., 2011). Hier wies lediglich einer von 13 untersuchten LCNEC eine EGFR-Mutation auf. Tyrosinkinaseinhibitoren schienen hier nicht Erfolg versprechend. Immerhin zwei der untersuchten Tumoren zeigten eine HER2/neu-Überexpression, sodass eine Therapie mit Trastuzumab zumindest diskutiert werden könnte.

Somit schlussfolgern wir, dass eine EGFR-Mutationsanalyse und eine HER2/neu-Immunhistochemie bei kolorektalen NEC verzichtbar ist.

5.5 Etablierung und Charakterisierung von zwei NEC Zelllinien

In enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. A. Krieg gelang erstmals die Etablierung zweier aus Metastasen gastrointestinaler LCNEC gewonnenen Zelllinien, die umfangreich elektronenmikroskopisch, immunhistochemisch und molekular charakterisiert wurden. Zusätzlich wurde die Tumorigenität evaluiert und die Sensitivität gegen Chemotherapeutika untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Zelllinien nicht nur ihre morphologischen und molekularen Charakteristika der Primärtumoren beibehielten, sondern auch eine Resistenz gegen die Chemotherapeutika, welche üblicherweise gegen NEC eingesetzt werden (Cisplatin, Etoposid, Oxaliplatin) (Krieg et al., 2014).

Gut charakterisierte Zelllinien von großzelligen NEC existierten bislang nicht. „Bislang wurden nur wenige GEP-NEN-Zelllinien etabliert, welche nur unzureichend charakterisiert waren“ (Krieg et al., 2014), sich zumeist auf Karzinoide bezogen oder aus NEN des Ileums oder Pankreas etabliert wurden (Tabelle 20) (Krieg et al., 2014). Wir konnten erstmals zwei Zelllinien aus LCNEC des gastroösophagealen Übergangs und des Kolons etablieren und umfangreich charakterisieren (Krieg et al., 2014). „Beide Zelllinien (NEC-DUE1 und NEC-DUE2) wiesen eine typische neuroendokrine Zytologie und ein Markerprofil auf, welches üblicherweise für Diagnostik und Charakterisierung von NEN eingesetzt wird“ (Krieg et al., 2014). VMAT1, ein Monoamin-Transporter wurde auf mRNA-Niveau in beiden Zelllinien detektiert (Krieg et al., 2014). „Nur die gastrische Zelllinie exprimierte jedoch VMAT2 auf mRNA-Level

(Abb. 9), ein Monoamin-Transporter, der charakteristisch für enterochromaffinartige (ECL) Zellen des Magens ist“ (Krieg et al., 2014).
Elektronenmikroskopisch konnte in beiden Linien typische neurosekretorische Granula nachgewiesen werden (Abb. 6 in Ergebnisse), sowie immunhistochemisch CDX2 (Abb.8 in Ergebnisse) (Krieg et al., 2014).

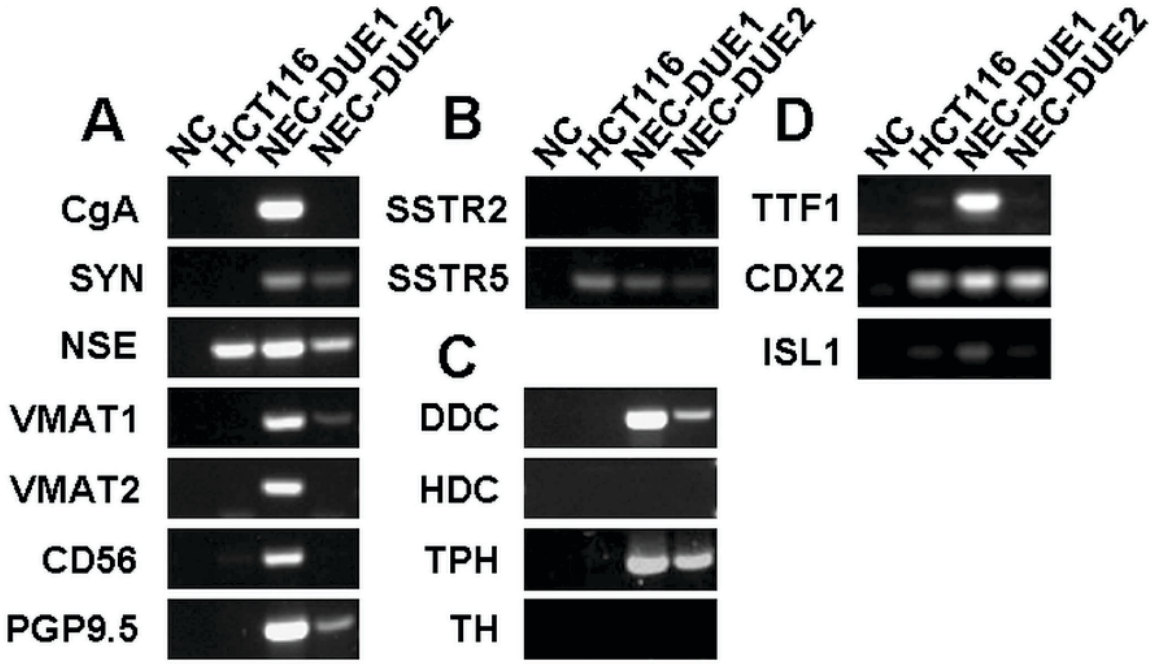


Abb. 9: Nachweis von Transkripten mittels RT-PCR (aus Krieg et al., 2014).

„RNA von kultivierten NEC Zelllinien wurde isoliert und eine RT-PCR wurde durchgeführt zum Nachweis von (A) generellen neuroendokrinen Markern, (B) Somatostatinrezeptoren, (C) spezifischen neuroendokrinen Markern und (D) Transkriptionsfaktoren. Die Kolonkarzinom-Zelllinien HCT116 diente als Kontrollzelllinie.“ (Krieg et al., 2014)

CD56 *cluster of differentiation* 56, **CDX2** *caudal type homeobox* 2, **CgA** Chromogranin A, **DDC** Dopa-Decarboxlase, **HDC** Histidin-Dekarboxylase, **ISL1** *islet-1,* **NC** Negativkontrolle, **NSE** Neuronspezifische Enolase, **PGP9.5** *protein gene product* 9.5, **SSTR** Somatostatinrezeptor, **SYN** Synaptophysin, **TH** Tyrosinhydroxylase, **TPH** Tryptophan-Hydroxylase, **TTF1** *thyroid transcription factor*, **VMAT** vesikuläre Monoamintransporter.

„Molekulares Profiling mittels komparativer genomischer Hybridisierung zeigte durchschnittlich 2,9 genomische Aberrationen in hochdifferenzierten gastrointestinalen NET. In unserer Studie wiesen beide Zelllinien eine höhere Anzahl genetischer Aberrationen auf, die mit dem aggressiveren biologische Verhalten korrespondierten. Wir beobachteten keinen partiellen oder vollständigen Verlust von Chromosom 18 (Löllgen et al., 2001). Allerdings wurde ein Hinzugewinn von Chromosom 7p und 20q, wie wir ihn in unseren beiden NEC-Zelllinien nachgewiesen haben, öfters in Studien beobachtet, die chromosomale Aberrationen in NEN untersucht haben (Zhao et al.,

2000) (Posorski et al., 2011)“ (Krieg et al., 2014). Insgesamt deuten vorangegangene Studien darauf hin, dass ein Hinzugewinn von Chromosomen häufiger auftritt als ihr Verlust (Krieg et al., 2014).

Beide Zelllinien zeigten ein traubenartiges Wachstum mit schwachen Zell-Zell-Kontakten in der 3D-Kultur (Krieg et al., 2014). Dieses Wachstumsmuster wurde besonders bei Zellkulturen beobachtet, die aus Metastasen etabliert wurden (Luca et al., 2013) (Krieg et al., 2014).

„Demnach zeigten beide Zelllinien nicht nur die typischen morphologischen und immunhistochemischen Marker neuroendokriner Tumoren, sondern behielten zusätzlich die morphologischen Charakteristika von Metastasenzellen sobald sie in einem passenden 3D-Mikroenvironment kultiviert wurden. Zusätzlich zu den malignen Fähigkeiten, welche beide Zelllinien sowohl in vitro als auch in vivo beibehielten, zeigten sie den typischen aggressiven und chemoresistenten Phänotyp, welcher in GEP-NEC beobachtet wurde.“ (Krieg et al., 2014).

5.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt, das großzellige neuroendokrine Karzinome im Gegensatz zu konventionellen Adenokarzinomen vermehrt BRAF-Mutationen aufweisen. Inwieweit BRAF-Inhibitoren für NEC-Patienten von therapeutisch einsetzbar sind, müssen zukünftige Studien zeigen.

Tabelle 21: Literatur zu Zelllinien neuroendokriner Neoplasien

Lokalisation Primarius	Histologische Beschreibung des Primarius	Untersuchungen an Zelllinie	Interpretation
Quinn et al 1979			
Sigma	1. Komponente "*moderately undifferentiated adenocarcinoma"* 2. Komponente: "*suggestive of a poorly differentiated carcinoid, no rosette, cord, or duct-like structures, cells were large, large globular nucleus, large nucleolus, infrequent mitotic figures"*	— heterologe Transplantation in Maus — Elektronen-mikroskopie — Zellproduktion Assays (Norepinephrin, Serotonin, ...) — Isozym-Analyse - Zytogenetik	wahrscheinlich MANEC
Lundqvist et al., 1991			
Kolon transversum	*"poorly differentiated neuroendocrine carcinoma growing in solid sheets and nests"*	— heterologe Transplantation in Maus — Immunhistologie — Zytogenetik — *Northern / Southern Blot (c-myc)* — In-situ-Hybridisierung (c-myc)	wahrscheinlich LCNEC
Takahashi et al., 2000			
Rektum	*"neuroendocrine carcinoma"*	— Elektronenmikrokopie — Verdopplungszeit — Zytogenetik — Immunhistologie — NSE- und Serotonin-Messung im Medium — Durchflusszytometrie (TGF-beta) — Wachstums-, Adhäsions-, Migrations- und Invasionsassays — Zymographie	wahrscheinlich LCNEC
Stilling et al., 2007			
1. Ileum 2. Rektum (Zellkulturen jeweils aus Lebermetastase)	—	— Immunhistologie — Zytogenetik — Western Blot (TGF-beta, EGFR) — RT-PCR (SSTR2A) — *Dose response* Analyse (Octreotid, Gefitinib) — Elektronenmikroskopie — Gen-Array	wahrscheinlich NET
Pfragner et al., 2009			
terminales Ileum (Zellkulturen aus Primarius, Lymphknoten- und Lebetmetastasen)	*"WHO III NET corresponding to a poorly differentiated NEC of partially solid, partially trabecular morphology with L1"*	— Immunhistologie — Zytogenetik — Komparative genomische Hybridisierung — MEN1-Screening — Transplantation in Maus	wahrscheinlich NET

EGFR epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, **LCNEC** großzelliges neuroendokrines Karzinom, **MANEC** gemischt adenoneuroendokrines Karzinom, **MEN** multiple endokrine Neoplasien, **NET** neuroendokriner Tumor, **NSE** Neuron-spezifische Enolase, **RT-PCR** real time Polymerasekettenreaktion, **SSTR** Somatostatinrezeptor, **TGF** Tumorwachstumsfaktor.

Literaturverzeichnis

Abate-Shen, C. (2002). Deregulated homeobox gene expression in cancer: cause or consequence? Nat. Rev. Cancer *2*, 777–785.

Akintola-Ogunremi, O., Pfeifer, J.D., Tan, B.R., Yan, Y., Zhu, X., Hart, J., Goldblum, J.R., Burgart, L., Lauwers, G.Y., Montgomery, E., et al. (2003). Analysis of protein expression and gene mutation of c-Kit in colorectal neuroendocrine carcinomas. Am. J. Surg. Pathol. *27*, 1551–1558.

Anlauf, M., Eissele, R., Schäfer, M.K.-H., Eiden, L.E., Arnold, R., Pauser, U., Klöppel, G., and Weihe, E. (2003). Expression of the two isoforms of the vesicular monoamine transporter (VMAT1 and VMAT2) in the endocrine pancreas and pancreatic endocrine tumors. J. Histochem. Cytochem. *51*, 1027–1040.

Anlauf, M., Schafer, M.K.-H., Depboylu, C., Hartschuh, W., Eiden, L.E., Kloppel, G., and Weihe, E. (2004). The vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) is expressed by normal and tumor cutaneous mast cells and Langerhans cells of the skin but is absent from Langerhans cell histiocytosis. J. Histochem. Cytochem. *52*, 779–788.

Anlauf, M., Schäfer, M.K.-H., Schwark, T., von Wurmb-Schwark, N., Brand, V., Sipos, B., Horny, H.-P., Parwaresch, R., Hartschuh, W., Eiden, L.E., et al. (2006). Vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) expression in hematopoietic cells and in patients with systemic mastocytosis. J. Histochem. Cytochem. *54*, 201–213.

Arnheim, N. (1990). The polymerase chain reaction. Genet. Eng. (N.Y.) *12*, 115–137.

Arnold, C.N., Nagasaka, T., Goel, A., Scharf, I., Grabowski, P., Sosnowski, A., Schmitt-Gräff, A., Boland, C.R., Arnold, R., and Blum, H.E. (2008). Molecular characteristics and predictors of survival in patients with malignant neuroendocrine tumors. Int. J. Cancer *123*, 1556–1564.

Attoub, S., Rivat, C., Rodrigues, S., Van Bocxlaer, S., Bedin, M., Bruyneel, E., Louvet, C., Kornprobst, M., André, T., Mareel, M., et al. (2002). The c-Kit tyrosine kinase inhibitor STI571 for colorectal cancer therapy. Cancer Res. *62*, 4879–4883.

Baldus, S.E., Schaefer, K.-L., Engers, R., Hartleb, D., Stoecklein, N.H., and Gabbert, H.E. (2010). Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in

primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases. Clin. Cancer Res. *16*, 790–799.

Barbareschi, M., Roldo, C., Zamboni, G., Capelli, P., Cavazza, A., Macri, E., Cangi, M.G., Chilosi, M., and Doglioni, C. (2004). CDX-2 homeobox gene product expression in neuroendocrine tumors: its role as a marker of intestinal neuroendocrine tumors. Am. J. Surg. Pathol. *28*, 1169–1176.

Basturk, O., Tang, L., Hruban, R.H., Adsay, V., Yang, Z., Krasinskas, A.M., Vakiani, E., La Rosa, S., Jang, K.-T., Frankel, W.L., et al. (2014). Poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the pancreas: a clinicopathologic analysis of 44 cases. Am. J. Surg. Pathol. *38*, 437–447.

Basturk, O., Yang, Z., Tang, L.H., Hruban, R.H., Adsay, V., McCall, C.M., Krasinskas, A.M., Jang, K.-T., Frankel, W.L., Balci, S., et al. (2015). The high-grade (WHO G3) pancreatic neuroendocrine tumor category is morphologically and biologically heterogenous and includes both well differentiated and poorly differentiated neoplasms. Am. J. Surg. Pathol. *39*, 683–690.

Bellone, G., Carbone, A., Sibona, N., Bosco, O., Tibaudi, D., Smirne, C., Martone, T., Gramigni, C., Camandona, M., Emanuelli, G., et al. (2001). Aberrant activation of c-Kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and enhances their invasive potential. Cancer Res. *61*, 2200–2206.

Bernick, P.E., Klimstra, D.S., Shia, J., Minsky, B., Saltz, L., Shi, W., Thaler, H., Guillem, J., Paty, P., Cohen, A.M., et al. (2004). Neuroendocrine carcinomas of the colon and rectum. Dis. Colon Rectum *47*, 163–169.

Binderup, T., Knigge, U., Loft, A., Mortensen, J., Pfeifer, A., Federspiel, B., Hansen, C.P., Højgaard, L., and Kjaer, A. (2010a). Functional imaging of neuroendocrine tumors: a head-to-head comparison of somatostatin receptor scintigraphy, 123I-MIBG scintigraphy, and 18F-FDG PET. J. Nucl. Med. *51*, 704–712.

Binderup, T., Knigge, U., Loft, A., Federspiel, B., and Kjaer, A. (2010b). 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts survival of patients with neuroendocrine tumors. Clin. Cancer Res. *16*, 978–985.

Blanke, C.D., Goldberg, R.M., Grothey, A., Mooney, M., Roach, N., Saltz, L.B., Welch, J.J., Wood, W.A., Meropol, N.J., and NCI GI Steering Committee Colon Cancer Task Force (2011). KRAS and colorectal cancer: ethical and pragmatic issues in effecting real-time change in oncology clinical trials and practice. Oncologist *16*, 1061–1068.

Børresen-Dale, A.L., Lothe, R.A., Meling, G.I., Hainaut, P., Rognum, T.O., and Skovlund, E. (1998). TP53 and long-term prognosis in colorectal cancer: mutations in the L3 zinc-binding domain predict poor survival. Clin. Cancer Res. *4*, 203–210.

Bras-Gonçalves, R.A., Rosty, C., Laurent-Puig, P., Soulié, P., Dutrillaux, B., and Poupon, M.F. (2000). Sensitivity to CPT-11 of xenografted human colorectal cancers as a function of microsatellite instability and p53 status. Br. J. Cancer *82*, 913–923.

Brennan, S.M., Gregory, D.L., Stillie, A., Herschtal, A., Mac Manus, M., and Ball, D.L. (2010). Should extrapulmonary small cell cancer be managed like small cell lung cancer? Cancer *116*, 888–895.

Brenner, B., Tang, L.H., Klimstra, D.S., and Kelsen, D.P. (2004a). Small-cell carcinomas of the gastrointestinal tract: a review. J. Clin. Oncol. *22*, 2730–2739.

Brenner, B., Shah, M.A., Gonen, M., Klimstra, D.S., Shia, J., and Kelsen, D.P. (2004b). Small-cell carcinoma of the gastrointestinal tract: a retrospective study of 64 cases. Br. J. Cancer *90*, 1720–1726.

Brunner, P., Jörg, A.-C., Glatz, K., Bubendorf, L., Radojewski, P., Umlauft, M., Marincek, N., Spanjol, P.-M., Krause, T., Dumont, R.A., et al. (2017). The prognostic and predictive value of sstr2-immunohistochemistry and sstr2-targeted imaging in neuroendocrine tumors. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging *44*, 468–475.

Burke, A.B., Shekitka, K.M., and Sobin, L.H. (1991). Small cell carcinomas of the large intestine. Am. J. Clin. Pathol. *95*, 315–321.

Calistri, D., Rengucci, C., Seymour, I., Lattuneddu, A., Polifemo, A.M., Monti, F., Saragoni, L., and Amadori, D. (2005). Mutation analysis of p53, K-ras, and BRAF genes in colorectal cancer progression. J. Cell. Physiol. *204*, 484–488.

Capalbo, C., Marchetti, P., Coppa, A., Calogero, A., Anastasi, E., Buffone, A., Belardinilli, F., Gulino, M., Frati, P., Catalano, C., et al. (2014). Vemurafenib and

panitumumab combination tailored therapy in BRAF-mutated metastatic colorectal cancer: A case report. Cancer Biol. Ther. *15*, 826–831.

Cariello, N.F., and Skopek, T.R. (1993). Mutational analysis using denaturing gradient gel electrophoresis and PCR. Mutat. Res. *288*, 103–112.

Carneiro F (Hrsg.) Bosman FT (Hrsg.), Hruban RH (Hrsg.), and Theise ND (Hrsg.) (2010). WHO Classification of Tumours of the Digestive System (Lyon: IARC press).

Cheng, J.Y., Sheu, L.F., Meng, C.L., and Lin, J.C. (1996). Expression of p53 protein in colorectal carcinoids. Arch Surg *131*, 67–70.

Cheuk, W., Kwan, M.Y., Suster, S., and Chan, J.K. (2001). Immunostaining for thyroid transcription factor 1 and cytokeratin 20 aids the distinction of small cell carcinoma from Merkel cell carcinoma, but not pulmonary from extrapulmonary small cell carcinomas. Arch. Pathol. Lab. Med. *125*, 228–231.

Cicin, I., Karagol, H., Uzunoglu, S., Uygun, K., Usta, U., Kocak, Z., Caloglu, M., Saynak, M., Tokatli, F., and Uzal, C. (2007). Extrapulmonary small-cell carcinoma compared with small-cell lung carcinoma: a retrospective single-center study. Cancer *110*, 1068–1076.

Conte, B., George, B., Overman, M., Estrella, J., Jiang, Z.-Q., Mehrvarz Sarshekeh, A., Ferrarotto, R., Hoff, P.M., Rashid, A., Yao, J.C., et al. (2016). High-Grade Neuroendocrine Colorectal Carcinomas: A Retrospective Study of 100 Patients. Clin Colorectal Cancer *15*, e1-7.

Coriat, R., Walter, T., Terris, B., Couvelard, A., and Ruszniewski, P. (2016). Gastroenteropancreatic Well-Differentiated Grade 3 Neuroendocrine Tumors: Review and Position Statement. Oncologist *21*, 1191–1199.

Crafa, P., Milione, M., Azzoni, C., Pilato, F.P., Pizzi, S., and Bordi, C. (2003). Pleomorph poorly differentiated endocrine carcinoma of the rectum. Virchows Arch. *442*, 605–610.

Cupisti, K., Ramp, U., Raffel, A., Krausch, M., Rehders, A., and Knoefel, W.T. (2008). Multiple giant scalp metastases of a follicular thyroid carcinoma. World J Surg Oncol *6*, 82.

Dacic, S., Finkelstein, S.D., Baksh, F.K., Swalsky, P.A., Barnes, L.E., and Yousem, S.A. (2002). Small-cell neuroendocrine carcinoma displays unique profiles of tumor-suppressor gene loss in relationship to the primary site of formation. Hum. Pathol. *33*, 927–932.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature *417*, 949–954.

Di Domenico, A., Wiedmer, T., Marinoni, I., and Perren, A. (2017). Genetic and epigenetic drivers of neuroendocrine tumours (NET). Endocr. Relat. Cancer *24*, R315–R334.

Di Nicolantonio, F., Martini, M., Molinari, F., Sartore-Bianchi, A., Arena, S., Saletti, P., De Dosso, S., Mazzucchelli, L., Frattini, M., Siena, S., et al. (2008). Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. J. Clin. Oncol. *26*, 5705–5712.

Estevez-Herrera, J., Pardo, M.R., Dominguez, N., Pereda, D., Machado, J.D., and Borges, R. (2013). The role of chromogranins in the secretory pathway. Biomol Concepts *4*, 605–609.

Ezziddin, S., Logvinski, T., Yong-Hing, C., Ahmadzadehfar, H., Fischer, H.-P., Palmedo, H., Bucerius, J., Reinhardt, M.J., and Biersack, H.-J. (2006). Factors predicting tracer uptake in somatostatin receptor and MIBG scintigraphy of metastatic gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. J. Nucl. Med. *47*, 223–233.

Ezziddin, S., Opitz, M., Attassi, M., Biermann, K., Sabet, A., Guhlke, S., Brockmann, H., Willinek, W., Wardelmann, E., Biersack, H.-J., et al. (2011). Impact of the Ki-67 proliferation index on response to peptide receptor radionuclide therapy. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging *38*, 459–466.

Fairley, J.A., Gilmour, K., and Walsh, K. (2012). Making the most of pathological specimens: molecular diagnosis in formalin-fixed, paraffin embedded tissue. Curr Drug Targets *13*, 1475–1487.

Fazio, N., and Milione, M. (2016). Heterogeneity of grade 3 gastroenteropancreatic neuroendocrine carcinomas: New insights and treatment implications. Cancer Treat. Rev. *50*, 61–67.

Fjällskog, M.-L., Ludvigsen, E., Stridsberg, M., Oberg, K., Eriksson, B., and Janson, E.T. (2003). Expression of somatostatin receptor subtypes 1 to 5 in tumor tissue and intratumoral vessels in malignant endocrine pancreatic tumors. Med. Oncol. *20*, 59–67.

Furlan, D., Cerutti, R., Genasetti, A., Pelosi, G., Uccella, S., La Rosa, S., and Capella, C. (2003). Microallelotyping defines the monoclonal or the polyclonal origin of mixed and collision endocrine-exocrine tumors of the gut. Lab. Invest. *83*, 963–971.

Furlan, D., Cerutti, R., Uccella, S., La Rosa, S., Rigoli, E., Genasetti, A., and Capella, C. (2004). Different molecular profiles characterize well-differentiated endocrine tumors and poorly differentiated endocrine carcinomas of the gastroenteropancreatic tract. Clin. Cancer Res. *10*, 947–957.

Furlan, D., Bernasconi, B., Uccella, S., Cerutti, R., Carnevali, I., and Capella, C. (2005). Allelotypes and fluorescence in situ hybridization profiles of poorly differentiated endocrine carcinomas of different sites. Clin. Cancer Res. *11*, 1765–1775.

Gaffey, M.J., Mills, S.E., and Lack, E.E. (1990). Neuroendocrine carcinoma of the colon and rectum. A clinicopathologic, ultrastructural, and immunohistochemical study of 24 cases. Am. J. Surg. Pathol. *14*, 1010–1023.

Gao, J., Li, Y.-Y., Sun, P.-N., and Shen, L. (2010). Comparative analysis of dideoxy sequencing, the KRAS StripAssay and pyrosequencing for detection of KRAS mutation. World J. Gastroenterol. *16*, 4858–4864.

Garcia-Carbonero, R., Sorbye, H., Baudin, E., Raymond, E., Wiedenmann, B., Niederle, B., Sedlackova, E., Toumpanakis, C., Anlauf, M., Cwikla, J.B., et al. (2016). ENETS Consensus Guidelines for High-Grade Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors and Neuroendocrine Carcinomas. Neuroendocrinology *103*, 186–194.

Gastrointestinal Pathology Study Group of Korean Society of Pathologists, Cho, M.-Y., Kim, J.M., Sohn, J.H., Kim, M.-J., Kim, K.-M., Kim, W.H., Kim, H., Kook, M.-C., Park, D.Y., et al. (2012). Current Trends of the Incidence and Pathological Diagnosis of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors (GEP-NETs) in Korea 2000-2009: Multicenter Study. Cancer Res Treat *44*, 157–165.

Gavert, N., Shvab, A., Sheffer, M., Ben-Shmuel, A., Haase, G., Bakos, E., Domany, E., and Ben-Ze'ev, A. (2013). c-Kit is suppressed in human colon cancer tissue and contributes to L1-mediated metastasis. Cancer Res. *73*, 5754–5763.

Gaztambide, S., Vazquez, F., and Castaño, L. (2013). Diagnosis and treatment of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). Minerva Endocrinol. *38*, 17–28.

Ghimenti, C., Lonobile, A., Campani, D., Bevilacqua, G., and Caligo, M.A. (1999). Microsatellite instability and allelic losses in neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. Int. J. Oncol. *15*, 361–366.

Girardi, D.M., Silva, A.C.B., Rêgo, J.F.M., Coudry, R.A., and Riechelmann, R.P. (2017). Unraveling molecular pathways of poorly differentiated neuroendocrine carcinomas of the gastroenteropancreatic system: A systematic review. Cancer Treat. Rev. *56*, 28–35.

Grabowski, P., Schönfelder, J., Ahnert-Hilger, G., Foss, H.-D., Heine, B., Schindler, I., Stein, H., Berger, G., Zeitz, M., and Scherübl, H. (2002). Expression of neuroendocrine markers: a signature of human undifferentiated carcinoma of the colon and rectum. Virchows Arch. *441*, 256–263.

Gross, D.J., Munter, G., Bitan, M., Siegal, T., Gabizon, A., Weitzen, R., Merimsky, O., Ackerstein, A., Salmon, A., Sella, A., et al. (2006). The role of imatinib mesylate (Glivec) for treatment of patients with malignant endocrine tumors positive for c-Kit or PDGF-R. Endocr. Relat. Cancer *13*, 535–540.

Haider, K., Shahid, R.K., Finch, D., Sami, A., Ahmad, I., Yadav, S., Alvi, R., Popkin, D., and Ahmed, S. (2006). Extrapulmonary small cell cancer: a Canadian province's experience. Cancer *107*, 2262–2269.

Hall, R.D., and Kudchadkar, R.R. (2014). BRAF Mutations: Signaling, Epidemiology, and Clinical Experience in Multiple Malignancies. Cancer Control *21*, 221–230.

Hammond, W.A., Crozier, J.A., Nakhleh, R.E., and Mody, K. (2016). Genomic profiling of high-grade large-cell neuroendocrine carcinoma of the colon. J Gastrointest Oncol *7*, E22-24.

Heetfeld, M., Chougnet, C.N., Olsen, I.H., Rinke, A., Borbath, I., Crespo, G., Barriuso, J., Pavel, M., O'Toole, D., Walter, T., et al. (2015). Characteristics and treatment of patients with G3 gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. Endocr. Relat. Cancer *22*, 657–664.

Hiddemann (Hrsg.), B. (Hrsg. . (2010). Die Onkologie (Heidelberg: Springer Medizin Verlag).

Hirschi, B., Gallmeier, E., Ziesch, A., Marschall, M., and Kolligs, F.T. (2014). Genetic targeting of B-RafV600E affects survival and proliferation and identifies selective agents against BRAF-mutant colorectal cancer cells. Mol. Cancer *13*, 122.

Hörsch, D., Weihe, E., Müller, S., and Hancke, E. (1992). Distribution and coexistence of chromogranin A-, serotonin- and pancreastatin-like immunoreactivity in endocrine-like cells of the human anal canal. Cell Tissue Res. *268*, 109–116.

Hyde, S.M., Cote, G.J., and Grubbs, E.G. (2017). Genetics of Multiple Endocrine Neoplasia Type 1/Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 Syndromes. Endocrinol. Metab. Clin. North Am. *46*, 491–502.

Iacopetta, B. (2003). TP53 mutation in colorectal cancer. Hum. Mutat. *21*, 271–276.

Ilett, E.E., Langer, S.W., Olsen, I.H., Federspiel, B., Kjær, A., and Knigge, U. (2015). Neuroendocrine Carcinomas of the Gastroenteropancreatic System: A Comprehensive Review. Diagnostics (Basel) *5*, 119–176.

Inomoto, C., and Osamura, R.Y. (2009). Formation of secretory granules by chromogranins. Med Mol Morphol *42*, 201–203.

Ishida, M., Sekine, S., Taniguchi, H., Fukagawa, T., Katai, H., and Kushima, R. (2014). Consistent absence of HER2 expression, regardless of HER2 amplification status, in neuroendocrine carcinomas of the stomach. Histopathology *64*, 1027–1031.

Ishikubo, T., Akagi, K., Kurosumi, M., Yamaguchi, K., Fujimoto, T., Sakamoto, H., Tanaka, Y., and Ochiai, A. (2006). Immunohistochemical and mutational analysis of c-Kit in gastrointestinal neuroendocrine cell carcinoma. Jpn. J. Clin. Oncol. *36*, 494–498.

Ito, M., Miyata, Y., Hirano, S., Kimura, S., Irisuna, F., Ikeda, K., Kushitani, K., Tsutani, Y., Ueda, D., Tsubokawa, N., et al. (2017). Therapeutic strategies and genetic profile comparisons in small cell carcinoma and large cell neuroendocrine carcinoma of the lung using next-generation sequencing. Oncotarget *8*, 108936–108945.

Iyoda, A., Travis, W.D., Sarkaria, I.S., Jiang, S.-X., Amano, H., Sato, Y., Saegusa, M., Rusch, V.W., and Satoh, Y. (2011). Expression profiling and identification of potential molecular targets for therapy in pulmonary large-cell neuroendocrine carcinoma. Exp Ther Med *2*, 1041–1045.

Iyoda, A., Jiang, S.-X., Travis, W.D., Kurouzu, N., Ogawa, F., Amano, H., Sato, Y., Rusch, V.W., Saegusa, M., and Satoh, Y. (2013). Clinicopathological features and the impact of the new TNM classification of malignant tumors in patients with pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. Mol Clin Oncol *1*, 437–443.

Jakobsen, A.M., Andersson, P., Saglik, G., Andersson, E., Kölby, L., Erickson, J.D., Forssell-Aronsson, E., Wängberg, B., Ahlman, H., and Nilsson, O. (2001). Differential expression of vesicular monoamine transporter (VMAT) 1 and 2 in gastrointestinal endocrine tumours. J. Pathol. *195*, 463–472.

Jernvall, P., Mäkinen, M., Karttunen, T., Mäkelä, J., and Vihko, P. (1997). Conserved region mutations of the p53 gene are concentrated in distal colorectal cancers. Int. J. Cancer *74*, 97–101.

Jesinghaus, M., Konukiewitz, B., Keller, G., Kloor, M., Steiger, K., Reiche, M., Penzel, R., Endris, V., Arsenic, R., Hermann, G., et al. (2017). Colorectal mixed adenoneuroendocrine carcinomas and neuroendocrine carcinomas are genetically closely related to colorectal adenocarcinomas. Mod. Pathol. *30*, 610–619.

Jiang, S.-X., Mikami, T., Umezawa, A., Saegusa, M., Kameya, T., and Okayasu, I. (2006). Gastric large cell neuroendocrine carcinomas: a distinct clinicopathologic entity. Am. J. Surg. Pathol. *30*, 945–953.

Kaemmerer, D., Träger, T., Hoffmeister, M., Sipos, B., Hommann, M., Sänger, J., Schulz, S., and Lupp, A. (2015). Inverse expression of somatostatin and CXCR4 chemokine receptors in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms of different malignancy. Oncotarget *6*, 27566–27579.

Kakar, S., Deng, G., Sahai, V., Matsuzaki, K., Tanaka, H., Miura, S., and Kim, Y.S. (2008). Clinicopathologic characteristics, CpG island methylator phenotype, and BRAF mutations in microsatellite-stable colorectal cancers without chromosomal instability. Arch. Pathol. Lab. Med. *132*, 958–964.

Kang, H., O'Connell, J.B., Leonardi, M.J., Maggard, M.A., McGory, M.L., and Ko, C.Y. (2007). Rare tumors of the colon and rectum: a national review. Int J Colorectal Dis *22*, 183–189.

Karapetis, C.S., Khambata-Ford, S., Jonker, D.J., O'Callaghan, C.J., Tu, D., Tebbutt, N.C., Simes, R.J., Chalchal, H., Shapiro, J.D., Robitaille, S., et al. (2008). K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N. Engl. J. Med. *359*, 1757–1765.

Karkouche, R., Bachet, J.-B., Sandrini, J., Mitry, E., Penna, C., Côté, J.-F., Blons, H., Penault-Llorca, F., Rougier, P., Saint André, J.-P., et al. (2012). Colorectal neuroendocrine carcinomas and adenocarcinomas share oncogenic pathways. A clinico-pathologic study of 12 cases. Eur J Gastroenterol Hepatol *24*, 1430–1437.

Kidd, M., Modlin, I., and Öberg, K. (2016). Towards a new classification of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. Nat Rev Clin Oncol *13*, 691–705.

Kleist, B., Kempa, M., Novy, M., Oberkanins, C., Xu, L., Li, G., Loland, C., and Poetsch, M. (2014). Comparison of neuroendocrine differentiation and KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA/TP53 mutation status in primary and metastatic colorectal cancer. Int J Clin Exp Pathol *7*, 5927–5939.

Klempner, S.J., Gershenhorn, B., Tran, P., Lee, T.K., Erlander, M.G., Gowen, K., Schrock, A.B., Morosini, D., Ross, J.S., Miller, V.A., et al. (2016). BRAFV600E Mutations in High-Grade Colorectal Neuroendocrine Tumors May Predict Responsiveness to BRAF-MEK Combination Therapy. Cancer Discov *6*, 594–600.

Klopfleisch, R., Weiss, A.T.A., and Gruber, A.D. (2011). Excavation of a buried treasure--DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. Histol. Histopathol. *26*, 797–810.

Klöppel, G. (2017). Neuroendocrine Neoplasms: Dichotomy, Origin and Classifications. Visc Med *33*, 324–330.

Knösel, T., Chen, Y., Altendorf-Hofmann, A., Danielczok, C., Freesmeyer, M., Settmacher, U., Wurst, C., Schulz, S., Yang, L.L., and Petersen, I. (2012). High KIT and PDGFRA are associated with shorter patients survival in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors, but mutations are a rare event. J. Cancer Res. Clin. Oncol. *138*, 397–403.

Knowles, F. (1965). NEUROENDOCRINE CORRELATIONS AT THE LEVEL OF ULTRASTRUCTURE. Arch Anat Microsc Morphol Exp *54*, 343–357.

Kojima, M., Ikeda, K., Saito, N., Sakuyama, N., Koushi, K., Kawano, S., Watanabe, T., Sugihara, K., Ito, M., and Ochiai, A. (2016). Neuroendocrine Tumors of the Large Intestine: Clinicopathological Features and Predictive Factors of Lymph Node Metastasis. Front Oncol *6*, 173.

Korse, C.M., Taal, B.G., van Velthuysen, M.-L.F., and Visser, O. (2013). Incidence and survival of neuroendocrine tumours in the Netherlands according to histological grade: experience of two decades of cancer registry. Eur. J. Cancer *49*, 1975–1983.

Krieg, A., Mersch, S., Boeck, I., Dizdar, L., Weihe, E., Hilal, Z., Krausch, M., Möhlendick, B., Topp, S.A., Piekorz, R.P., et al. (2014). New model for gastroenteropancreatic large-cell neuroendocrine carcinoma: establishment of two clinically relevant cell lines. PLoS ONE *9*, e88713.

Kriek, E., Den Engelse, L., Scherer, E., and Westra, J.G. (1984). Formation of DNA modifications by chemical carcinogens. Identification, localization and quantification. Biochim. Biophys. Acta *738*, 181–201.

La Rosa, S., Marando, A., Furlan, D., Sahnane, N., and Capella, C. (2012). Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas and mixed adenoneuroendocrine carcinomas: insights into the diagnostic immunophenotype, assessment of methylation profile, and search for prognostic markers. Am. J. Surg. Pathol. *36*, 601–611.

Lakhani, V.T., You, Y.N., and Wells, S.A. (2007). The multiple endocrine neoplasia syndromes. Annu. Rev. Med. *58*, 253–265.

Lee, S.S., Lee, J.-L., Ryu, M.-H., Chang, H.M., Kim, T.W., Kim, W.K., Lee, J.S., Jang, S.-J., Khang, S.K., and Kang, Y.-K. (2007). Extrapulmonary small cell carcinoma: single center experience with 61 patients. Acta Oncol *46*, 846–851.

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, and AWMF) S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.0, 2017, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL.

Li, A.F.-Y., Tsay, S.-H., Liang, W.-Y., Li, W.-Y., and Chen, J.-Y. (2006). Clinical significance of p16INK4a and p53 overexpression in endocrine tumors of the gastrointestinal tract. Am. J. Clin. Pathol. *126*, 856–865.

Li, A.F.-Y., Li, A.C.-H., Hsu, C.-Y., Li, W.-Y., Hsu, H.-S., and Chen, J.-Y. (2010). Small cell carcinomas in gastrointestinal tract: immunohistochemical and clinicopathological features. J. Clin. Pathol. *63*, 620–625.

Li, J., Wang, Y., Han, F., Wang, Z., Xu, L., and Tong, J. (2016). Disadvantage of survival outcomes in widowed patients with colorectal neuroendocrine neoplasm: an analysis of surveillance, epidemiology and end results database. Oncotarget *7*, 83200–83207.

Lindl, T., and Gstraunthaler, G. (2008). Zell- und Gewebekultur: von den Grundlagen zur Laborbank (Heidelberg: Spektrum Akad. Verl).

Löllgen, R.M., Hessman, O., Szabo, E., Westin, G., and Akerström, G. (2001). Chromosome 18 deletions are common events in classical midgut carcinoid tumors. Int. J. Cancer *92*, 812–815.

Luca, A.C., Mersch, S., Deenen, R., Schmidt, S., Messner, I., Schäfer, K.-L., Baldus, S.E., Huckenbeck, W., Piekorz, R.P., Knoefel, W.T., et al. (2013). Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. PLoS ONE *8*, e59689.

Lundqvist, M., Mark, J., Funa, K., Heldin, N.E., Morstyn, G., Wedell, B., Layton, J., and Oberg, K. (1991). Characterisation of a cell line (LCC-18) from a cultured human neuroendocrine-differentiated colonic carcinoma. Eur. J. Cancer *27*, 1663–1668.

Malapelle, U., Bellevicine, C., Salatiello, M., de Luca, C., Rispo, E., Riccio, P., Sparano, L., De Stefano, A., Carlomagno, C., Maiello, F.M., et al. (2012). Sanger sequencing in routine KRAS testing: a review of 1720 cases from a pathologist's perspective. J. Clin. Pathol. *65*, 940–944.

Mathonnet, M., Perraud, A., Christou, N., Akil, H., Melin, C., Battu, S., Jauberteau, M.-O., and Denizot, Y. (2014). Hallmarks in colorectal cancer: angiogenesis and cancer stem-like cells. World J. Gastroenterol. *20*, 4189–4196.

Messner, I., Cadeddu, G., Huckenbeck, W., Knowles, H.J., Gabbert, H.E., Baldus, S.E., and Schaefer, K.-L. (2013). KRAS p.G13D mutations are associated with sensitivity to anti-EGFR antibody treatment in colorectal cancer cell lines. J. Cancer Res. Clin. Oncol. *139*, 201–209.

Micke, P., Basrai, M., Faldum, A., Bittinger, F., Rönnstrand, L., Blaukat, A., Beeh, K.M., Oesch, F., Fischer, B., Buhl, R., et al. (2003). Characterization of c-Kit expression in small cell lung cancer: prognostic and therapeutic implications. Clin. Cancer Res. *9*, 188–194.

Milione, M., Maisonneuve, P., Spada, F., Pellegrinelli, A., Spaggiari, P., Albarello, L., Pisa, E., Barberis, M., Vanoli, A., Buzzoni, R., et al. (2017). The Clinicopathologic Heterogeneity of Grade 3 Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms: Morphological Differentiation and Proliferation Identify Different Prognostic Categories. Neuroendocrinology *104*, 85–93.

Mills, S.E., Allen, M.S., and Cohen, A.R. (1983). Small-cell undifferentiated carcinoma of the colon. A clinicopathological study of five cases and their association with colonic adenomas. Am. J. Surg. Pathol. *7*, 643–651.

Moyana, T.N., Xiang, J., Senthilselvan, A., and Kulaga, A. (2000). The spectrum of neuroendocrine differentiation among gastrointestinal carcinoids: importance of histologic grading, MIB-1, p53, and bcl-2 immunoreactivity. Arch. Pathol. Lab. Med. *124*, 570–576.

Nagtegaal, I.D., and Hugen, N. (2015). The Increasing Relevance of Tumour Histology in Determining Oncological Outcomes in Colorectal Cancer. Curr Colorectal Cancer Rep *11*, 259–266.

Namikawa, T., Oki, T., Kitagawa, H., Okabayashi, T., Kobayashi, M., and Hanazaki, K. (2013). Neuroendocrine carcinoma of the stomach: clinicopathological and immunohistochemical evaluation. Med Mol Morphol *46*, 34–40.

Nicklas, J.A., and Buel, E. (2003). Quantification of DNA in forensic samples. Anal Bioanal Chem *376*, 1160–1167.

Nitadori, J., Ishii, G., Tsuta, K., Yokose, T., Murata, Y., Kodama, T., Nagai, K., Kato, H., and Ochiai, A. (2006). Immunohistochemical differential diagnosis between large cell neuroendocrine carcinoma and small cell carcinoma by tissue microarray analysis with a large antibody panel. Am. J. Clin. Pathol. *125*, 682–692.

Norose, T., Ohike, N., Imai, H., Shibata, H., Suzuki, R., Isobe, T., Asonuma, K., Kuroki, Y., Nagahama, M., Tanaka, J.-I., et al. (2017). A case of rectal neuroendocrine carcinoma in a patient with long-standing ulcerative colitis involving alterations of the p16-Rb pathway. Pathol. Int. *67*, 526–530.

Olevian, D.C., Nikiforova, M.N., Chiosea, S., Sun, W., Bahary, N., Kuan, S.-F., and Pai, R.K. (2016). Colorectal poorly differentiated neuroendocrine carcinomas frequently exhibit BRAF mutations and are associated with poor overall survival. Hum. Pathol. *49*, 124–134.

Ordóñez, N.G. (2000). Value of thyroid transcription factor-1 immunostaining in distinguishing small cell lung carcinomas from other small cell carcinomas. Am. J. Surg. Pathol. *24*, 1217–1223.

O'Toole, D., Couvelard, A., Rebours, V., Zappa, M., Hentic, O., Hammel, P., Levy, P., Bedossa, P., Raymond, E., and Ruszniewski, P. (2010). Molecular markers associated with response to chemotherapy in gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors. Endocr. Relat. Cancer *17*, 847–856.

Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S., and Comoglio, P.M. (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. Cancer Cell *3*, 347–361.

Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S.V., Hainaut, P., and Olivier, M. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. Hum. Mutat. *28*, 622–629.

Pfragner, R., Behmel, A., Höger, H., Beham, A., Ingolic, E., Stelzer, I., Svejda, B., Moser, V.A., Obenauf, A.C., Siegl, V., et al. (2009). Establishment and characterization of three novel cell lines - P-STS, L-STS, H-STS - derived from a human metastatic midgut carcinoid. Anticancer Res. *29*, 1951–1961.

Pizzi, S., Azzoni, C., Bassi, D., Bottarelli, L., Milione, M., and Bordi, C. (2003). Genetic alterations in poorly differentiated endocrine carcinomas of the gastrointestinal tract. Cancer *98*, 1273–1282.

Posorski, N., Kaemmerer, D., Ernst, G., Grabowski, P., Hoersch, D., Hommann, M., and von Eggeling, F. (2011). Localization of sporadic neuroendocrine tumors by gene expression analysis of their metastases. Clin. Exp. Metastasis *28*, 637–647.

Prahallad, A., Sun, C., Huang, S., Di Nicolantonio, F., Salazar, R., Zecchin, D., Beijersbergen, R.L., Bardelli, A., and Bernards, R. (2012). Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. Nature *483*, 100–103.

Przygodzki, R.M., Finkelstein, S.D., Langer, J.C., Swalsky, P.A., Fishback, N., Bakker, A., Guinee, D.G., Koss, M., and Travis, W.D. (1996). Analysis of p53, K-ras-2, and C-raf-1 in pulmonary neuroendocrine tumors. Correlation with histological subtype and clinical outcome. Am. J. Pathol. *148*, 1531–1541.

Qian, Z.R., Li, T., Ter-Minassian, M., Yang, J., Chan, J.A., Brais, L.K., Masugi, Y., Thiaglingam, A., Brooks, N., Nishihara, R., et al. (2016). Association Between Somatostatin Receptor Expression and Clinical Outcomes in Neuroendocrine Tumors. Pancreas *45*, 1386–1393.

Quinn, L.A., Moore, G.E., Morgan, R.T., and Woods, L.K. (1979). Cell lines from human colon carcinoma with unusual cell products, double minutes, and homogeneously staining regions. Cancer Res. *39*, 4914–4924.

Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Velculescu, V.E. (2002). Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. Nature *418*, 934.

Raskov, H., Pommergaard, H.-C., Burcharth, J., and Rosenberg, J. (2014). Colorectal carcinogenesis--update and perspectives. World J. Gastroenterol. *20*, 18151–18164.

Rindi, G., Bordi, C., Rappel, S., La Rosa, S., Stolte, M., and Solcia, E. (1996). Gastric carcinoids and neuroendocrine carcinomas: pathogenesis, pathology, and behavior. World J Surg *20*, 168–172.

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

Robert Koch-Institut (2017). Krebs in Deutschland für 2013/2014.

Saclarides, T.J., Szeluga, D., and Staren, E.D. (1994). Neuroendocrine cancers of the colon and rectum. Results of a ten-year experience. Dis. Colon Rectum *37*, 635–642.

Sahnane, N., Furlan, D., Monti, M., Romualdi, C., Vanoli, A., Vicari, E., Solcia, E., Capella, C., Sessa, F., and La Rosa, S. (2015). Microsatellite unstable gastrointestinal

neuroendocrine carcinomas: a new clinicopathologic entity. Endocr. Relat. Cancer *22*, 35–45.

Samowitz, W.S., Curtin, K., Ma, K., Edwards, S., Schaffer, D., Leppert, M.F., and Slattery, M.L. (2002). Prognostic significance of p53 mutations in colon cancer at the population level. Int. J. Cancer *99*, 597–602.

Saridaki, Z., Papadatos-Pastos, D., Tzardi, M., Mavroudis, D., Bairaktari, E., Arvanity, H., Stathopoulos, E., Georgoulias, V., and Souglakos, J. (2010). BRAF mutations, microsatellite instability status and cyclin D1 expression predict metastatic colorectal patients' outcome. Br. J. Cancer *102*, 1762–1768.

Scardoni, M., Vittoria, E., Volante, M., Rusev, B., Bersani, S., Mafficini, A., Gottardi, M., Giandomenico, V., Malleo, G., Butturini, G., et al. (2014). Mixed adenoneuroendocrine carcinomas of the gastrointestinal tract: targeted next-generation sequencing suggests a monoclonal origin of the two components. Neuroendocrinology *100*, 310–316.

Scarpa, A., Chang, D.K., Nones, K., Corbo, V., Patch, A.-M., Bailey, P., Lawlor, R.T., Johns, A.L., Miller, D.K., Mafficini, A., et al. (2017). Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. Nature *543*, 65–71.

Scherübl, H., Streller, B., Stabenow, R., Herbst, H., Höpfner, M., Schwertner, C., Steinberg, J., Eick, J., Ring, W., Tiwari, K., et al. (2013). Clinically detected gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors are on the rise: epidemiological changes in Germany. World J. Gastroenterol. *19*, 9012–9019.

Schütz, B., Schäfer, M.K., Eiden, L.E., and Weihe, E. (1998). Vesicular amine transporter expression and isoform selection in developing brain, peripheral nervous system and gut. Brain Res. Dev. Brain Res. *106*, 181–204.

Sclafani, F., Carnaghi, C., Di Tommaso, L., Rodari, M., Destro, A., Rimassa, L., Giordano, L., Chiti, A., Roncalli, M., and Santoro, A. (2011). Detection of somatostatin receptor subtypes 2 and 5 by somatostatin receptor scintigraphy and immunohistochemistry: clinical implications in the diagnostic and therapeutic management of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Tumori *97*, 620–628.

Shafqat, H., Ali, S., Salhab, M., and Olszewski, A.J. (2015). Survival of patients with neuroendocrine carcinoma of the colon and rectum: a population-based analysis. Dis. Colon Rectum *58*, 294–303.

Shia, J., Tickoo, S.K., Guillem, J.G., Qin, J., Nissan, A., Hoos, A., Stojadinovic, A., Ruo, L., Wong, W.D., Paty, P.B., et al. (2002). Increased endocrine cells in treated rectal adenocarcinomas: a possible reflection of endocrine differentiation in tumor cells induced by chemotherapy and radiotherapy. Am. J. Surg. Pathol. *26*, 863–872.

Shia, J., Tang, L.H., Weiser, M.R., Brenner, B., Adsay, N.V., Stelow, E.B., Saltz, L.B., Qin, J., Landmann, R., Leonard, G.D., et al. (2008). Is nonsmall cell type high-grade neuroendocrine carcinoma of the tubular gastrointestinal tract a distinct disease entity? Am. J. Surg. Pathol. *32*, 719–731.

Simi, L., Pratesi, N., Vignoli, M., Sestini, R., Cianchi, F., Valanzano, R., Nobili, S., Mini, E., Pazzagli, M., and Orlando, C. (2008). High-resolution melting analysis for rapid detection of KRAS, BRAF, and PIK3CA gene mutations in colorectal cancer. Am. J. Clin. Pathol. *130*, 247–253.

Smith, J.D., Reidy, D.L., Goodman, K.A., Shia, J., and Nash, G.M. (2014). A retrospective review of 126 high-grade neuroendocrine carcinomas of the colon and rectum. Ann. Surg. Oncol. *21*, 2956–2962.

Sorbye, H., Welin, S., Langer, S.W., Vestermark, L.W., Holt, N., Osterlund, P., Dueland, S., Hofsli, E., Guren, M.G., Ohrling, K., et al. (2013). Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. Ann. Oncol. *24*, 152–160.

Sorbye, H., Strosberg, J., Baudin, E., Klimstra, D.S., and Yao, J.C. (2014). Gastroenteropancreatic high-grade neuroendocrine carcinoma. Cancer *120*, 2814–2823.

Souglakos, J., Philips, J., Wang, R., Marwah, S., Silver, M., Tzardi, M., Silver, J., Ogino, S., Hooshmand, S., Kwak, E., et al. (2009). Prognostic and predictive value of common mutations for treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer. Br. J. Cancer *101*, 465–472.

Sproll, C., Freund, A.K., Hassel, A., Hölbling, M., Aust, V., Storb, S.H., Handschel, J., Teichmann, C., Depprich, R., Behrens, B., et al. (2017). Immunohistochemical detection of lymph node-DTCs in patients with node-negative HNSCC. Int. J. Cancer *140*, 2112–2124.

Srirajaskanthan, R., Watkins, J., Marelli, L., Khan, K., and Caplin, M.E. (2009). Expression of somatostatin and dopamine 2 receptors in neuroendocrine tumours and the potential role for new biotherapies. Neuroendocrinology *89*, 308–314.

Staren, E.D., Gould, V.E., Warren, W.H., Wool, N.L., Bines, S., Baker, J., Bonomi, P., Roseman, D.L., and Economou, S.G. (1988). Neuroendocrine carcinomas of the colon and rectum: a clinicopathologic evaluation. Surgery *104*, 1080–1089.

Stelow, E.B., Moskaluk, C.A., and Mills, S.E. (2006). The mismatch repair protein status of colorectal small cell neuroendocrine carcinomas. Am. J. Surg. Pathol. *30*, 1401–1404.

Stilling, G.A., Zhang, H., Ruebel, K.H., Leontovich, A.A., Jin, L., Tanizaki, Y., Zhang, S., Erickson, L.A., Hobday, T., and Lloyd, R.V. (2007). Characterization of the functional and growth properties of cell lines established from ileal and rectal carcinoid tumors. Endocr. Pathol. *18*, 223–232.

Strosberg, J.R., Coppola, D., Klimstra, D.S., Phan, A.T., Kulke, M.H., Wiseman, G.A., Kvols, L.K., and North American Neuroendocrine Tumor Society (NANETS) (2010). The NANETS consensus guidelines for the diagnosis and management of poorly differentiated (high-grade) extrapulmonary neuroendocrine carcinomas. Pancreas *39*, 799–800.

Suttorp, M., and Schmitz, N. (1997). [Polymerase chain reaction]. Med. Klin. (Munich) *92*, 37–40.

Szylberg, Ł., Janiczek, M., Popiel, A., and Marszałek, A. (2015). Large Bowel Genetic Background and Inflammatory Processes in Carcinogenesis--Systematic Review. Adv Clin Exp Med *24*, 555–563.

Takahashi, Y., Onda, M., Tanaka, N., and Seya, T. (2000). Establishment and characterization of two new rectal neuroendocrine cell carcinoma cell lines. Digestion *62*, 262–270.

Takizawa, N., Ohishi, Y., Hirahashi, M., Takahashi, S., Nakamura, K., Tanaka, M., Oki, E., Takayanagi, R., and Oda, Y. (2015). Molecular characteristics of colorectal neuroendocrine carcinoma; similarities with adenocarcinoma rather than neuroendocrine tumor. Hum. Pathol. *46*, 1890–1900.

Tang, L.H., Gonen, M., Hedvat, C., Modlin, I.M., and Klimstra, D.S. (2012). Objective quantification of the Ki67 proliferative index in neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system: a comparison of digital image analysis with manual methods. Am. J. Surg. Pathol. *36*, 1761–1770.

Tang, L.H., Basturk, O., Sue, J.J., and Klimstra, D.S. (2016). A Practical Approach to the Classification of WHO Grade 3 (G3) Well-differentiated Neuroendocrine Tumor (WD-NET) and Poorly Differentiated Neuroendocrine Carcinoma (PD-NEC) of the Pancreas. Am. J. Surg. Pathol. *40*, 1192–1202.

Terashima, T., Morizane, C., Hiraoka, N., Tsuda, H., Tamura, T., Shimada, Y., Kaneko, S., Kushima, R., Ueno, H., Kondo, S., et al. (2012). Comparison of chemotherapeutic treatment outcomes of advanced extrapulmonary neuroendocrine carcinomas and advanced small-cell lung carcinoma. Neuroendocrinology *96*, 324–332.

Travis, W.D., Linnoila, R.I., Tsokos, M.G., Hitchcock, C.L., Cutler, G.B., Nieman, L., Chrousos, G., Pass, H., and Doppman, J. (1991). Neuroendocrine tumors of the lung with proposed criteria for large-cell neuroendocrine carcinoma. An ultrastructural, immunohistochemical, and flow cytometric study of 35 cases. Am. J. Surg. Pathol. *15*, 529–553.

Uccella, S., Cerutti, R., Vigetti, D., Furlan, D., Oldrini, R., Carnevali, I., Pelosi, G., La Rosa, S., Passi, A., and Capella, C. (2006). Histidine decarboxylase, DOPA decarboxylase, and vesicular monoamine transporter 2 expression in neuroendocrine tumors: immunohistochemical study and gene expression analysis. J. Histochem. Cytochem. *54*, 863–875.

Uccella, S., La Rosa, S., Volante, M., and Papotti, M. (2018). Immunohistochemical Biomarkers of Gastrointestinal, Pancreatic, Pulmonary, and Thymic Neuroendocrine Neoplasms. Endocr. Pathol. *29*, 150–168.

Van Buren, G., Rashid, A., Yang, A.D., Abdalla, E.K., Gray, M.J., Liu, W., Somcio, R., Fan, F., Camp, E.R., Yao, J.C., et al. (2007). The development and characterization of a human midgut carcinoid cell line. Clin. Cancer Res. *13*, 4704–4712.

Vaughn, C.P., Zobell, S.D., Furtado, L.V., Baker, C.L., and Samowitz, W.S. (2011). Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. Genes Chromosomes Cancer *50*, 307–312.

Vélayoudom-Céphise, F.-L., Duvillard, P., Foucan, L., Hadoux, J., Chougnet, C.N., Leboulleux, S., Malka, D., Guigay, J., Goere, D., Debaere, T., et al. (2013). Are G3 ENETS neuroendocrine neoplasms heterogeneous? Endocr. Relat. Cancer *20*, 649–657.

Vergelí-Rojas, J.A., Santiago-Caraballo, D.L., Cáceres-Perkins, W., Magno-Pagatzartundua, P., and Toro, D.H. (2013). Small cell neuroendocrine carcinoma of rectum with associated paraneoplastic syndrome: a case report. P R Health Sci J *32*, 51–53.

Vijayvergia, N., Boland, P.M., Handorf, E., Gustafson, K.S., Gong, Y., Cooper, H.S., Sheriff, F., Astsaturov, I., Cohen, S.J., and Engstrom, P.F. (2016). Molecular profiling of neuroendocrine malignancies to identify prognostic and therapeutic markers: a Fox Chase Cancer Center Pilot Study. British Journal of Cancer *115*, 564–570.

Vogl, T.J., Schmiegel, W., Pox, C., Pereira, P.L., Brambs, H.J., Lux, P., Fischer, S., and German Society for Digestive and Metabolic Diseases (2013). [S3 guideline--Diagnosis and treatment of colorectal carcinoma: relevance for radiologic imaging and interventions]. Rofo *185*, 699–708.

Vortmeyer, A.O., Lubensky, I.A., Merino, M.J., Wang, C.Y., Pham, T., and Furth, E.E. (1997). Concordance of genetic alterations in poorly differentiated colorectal neuroendocrine carcinomas and associated adenocarcinomas. J. Natl. Cancer Inst. *89*, 1448–1453.

Walenkamp, A.M.E., Sonke, G.S., and Sleijfer, D.T. (2009). Clinical and therapeutic aspects of extrapulmonary small cell carcinoma. Cancer Treat. Rev. *35*, 228–236.

Wick, M.R., Vitsky, J.L., Ritter, J.H., Swanson, P.E., and Mills, S.E. (2005). Sporadic medullary carcinoma of the colon: a clinicopathologic comparison with nonhereditary poorly differentiated enteric-type adenocarcinoma and neuroendocrine colorectal carcinoma. Am. J. Clin. Pathol. *123*, 56–65.

Wiedenmann, B. (1991). Synaptophysin. A widespread constituent of small neuroendocrine vesicles and a new tool in tumor diagnosis. Acta Oncol *30*, 435–440.

Woischke, C., Schaaf, C.W., Yang, H.-M., Vieth, M., Veits, L., Geddert, H., Märkl, B., Stömmer, P., Schaeffer, D.F., Frölich, M., et al. (2017). In-depth mutational analyses of colorectal neuroendocrine carcinomas with adenoma or adenocarcinoma components. Mod. Pathol. *30*, 95–103.

Yachida, S., Vakiani, E., White, C.M., Zhong, Y., Saunders, T., Morgan, R., de Wilde, R.F., Maitra, A., Hicks, J., Demarzo, A.M., et al. (2012). Small cell and large cell neuroendocrine carcinomas of the pancreas are genetically similar and distinct from well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors. Am. J. Surg. Pathol. *36*, 173–184.

Zaanan, A., Cuilliere-Dartigues, P., Guilloux, A., Parc, Y., Louvet, C., de Gramont, A., Tiret, E., Dumont, S., Gayet, B., Validire, P., et al. (2010). Impact of p53 expression and microsatellite instability on stage III colon cancer disease-free survival in patients treated by 5-fluorouracil and leucovorin with or without oxaliplatin. Ann. Oncol. *21*, 772–780.

Zhang, Y., Xie, J., Wang, J., Yang, D., Jiang, Z., Han, G., Fu, Q., and Zhang, Y. (2016). Clinicopathological and Prognostic Analysis of Neuroendocrine Carcinoma of the Colorectum. Adv Clin Exp Med *25*, 719–724.

Zhao, J., de Krijger, R.R., Meier, D., Speel, E.J., Saremaslani, P., Muletta-Feurer, S., Matter, C., Roth, J., Heitz, P.U., and Komminoth, P. (2000). Genomic alterations in well-differentiated gastrointestinal and bronchial neuroendocrine tumors (carcinoids): marked differences indicating diversity in molecular pathogenesis. Am. J. Pathol. *157*, 1431–1438.

(2015). WHO classification of tumours of lung, pleura, thymus and heart: ... reflects the views of a working group that convened for a consensus and editorial meeting at the International Agency for Research on Cancer, Lyon, April 24 - 26, 2014 (Lyon: International Agency for Research on Cancer).

(2017a). WHO classification of tumours of endocrine organs (Lyon: International Agency for Research on Cancer).

(2017b). TNM - Klassifikation maligner Tumoren (Weinheim: Wiley-VCH Verlag

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Anlauf für die Vergabe des Promotionsthemas und die stets zeitnahe engagierte Diskussion von Studiendesign, Ergebnissen und Präsentation. Seine wissenschaftliche Erfahrung, Vernetzung mit den unten aufgeführten Kooperationspartnern, Fokussierung auf die zentralen Fragestellungen, Geduld und Motivation waren für Zustandekommen und Durchführung dieser Dissertation unerlässlich.

Prof. Dr. med. Helmut Erich Gabbert, ehemaliger Direktor des Instituts für Pathologie am Universitätsklinikum Düsseldorf, danke ich für die kontinuierliche Unterstützung und die Möglichkeit auf institutseigene Räumlichkeiten, Materialien und Personal zurückgreifen zu können.

Dies sind im Einzelnen:
Frau Nadine Makowski geb. Reulen, MTA der Biomaterialbank, welche hervorragende Schnittpräparate angefertigt hat.
Frau Sabine Schneeloch, MTA des immunhistochemischen Labors, die stets zeitnahe und qualitativ hochwertige immunhistochemischen Färbungen erstellte.
Das Team des Molekularpathologischen Labors um Herrn PD Dr. rer. nat. Ludwig Schäfer und MTA Frau Anna Maria Niermann für die Durchführung der molekularpathologischen Untersuchungen.
MTA Frau Sigrid Khalil, die hochwertige elektronenmikroskopische Präparate angefertigt hat.

Die hier vorgelegte Dissertationsarbeit war Bestandteil von mehreren Kooperationsprojekten zur Charakterisierung großzelliger neuroendokriner Karzinome. Für die enge Zusammenarbeit gilt mein besonderer Dank: Prof. Dr. Eberhard Weihe, Direktor des Instituts für Anatomie und Zellbiologie am Universitätsklinikum Marburg (Durchführung der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie).
Prof. Dr. Andreas Krieg, Oberarzt der Klinik für Allgemeine und Viszeralchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf (Etablierung der Zellkulturen und deren Charakterisierung mittels RT-PCR).

Prof. Dr. Andreas Raffel und PD Dr. Markus Krausch, Oberärzte der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf (Bereitstellung von klinischen Follow-up-Daten der am Universitätsklinikum Düsseldorf behandelten Patienten).
Prof. Dr. Hans-Jörg Krämling, Chefarzt der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie und Prof. Dr. Horst Neuhaus, Chefarzt der Klinik für Innere Medizin am Evangelischen Krankenhaus Düsseldorf (Bereitstellung detaillierter Follow-up-Daten der am EVK behandelten Patienten).

Firma Novartis, vertreten durch Herrn Dr. Benedikt Mönig, gilt besonderer Dank für die finanzielle Förderung im Rahmen der Initiative zur Förderung wissenschaftlichen Nachwuchses (YING) sowie die Möglichkeit, meine Forschungsergebnisse im Rahmen regelmäßiger Fachtagungen vorstellen und diskutieren zu können.