

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

# **EpCAM – ein potentiell neuer Prognosemarker neuroendokriner Neoplasien (NEN)**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Saskia Pickhardt

2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ. Prof. Dr. med. Wolfram Trudo Knoefel

Zweitgutachter: Univ. Prof. Dr. med. Matthias Schott

**Für meine Eltern**

- **Zusammenfassung (deutsch)**

Viele Karzinome zeigen eine Überexpression des epithelialen Zelladhäsionsmoleküls (epithelial cell adhesion molecule) EpCAM. EpCAM kommt auf der Zelloberfläche verschiedener Epithelzellen vor und vermittelt Zell-Zell-Kontakte. Die Zell-Zell-

Adhäsion durch EpCAM ist im Vergleich zu durch andere Adhäsionsmoleküle ausgelöste Kontakte weniger stark ausgeprägt. Neben der Zelladhäsion gehören die Induktion der Zellproliferation und die Expression Karzinom-assoziiertes Proteine zu den Effekten von EpCAM.

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse der EpCAM-Expression in Gastro-entero-pankreatischen-(GEP)-Neuroendokrinen Neoplasien (NEN) und der potentiellen Rolle von EpCAM als Prognosemarker für einen malignen Verlauf. Zu diesem Zweck wurden Gewebeproben des Primarius von 85 Patienten mit NEN und zusätzlich 14 Lymphknoten- (LN) und 9 Fernmetastasen hinsichtlich der EpCAM- und Ki-67-Expression mittels Tissue Microarray (TMA) immunhistochemisch analysiert. Anschließend erfolgte eine Korrelationsanalyse der EpCAM-Daten mit den klinischen und pathologischen Parametern der Patienten. Besonderes Augenmerk galt der möglichen prognostischen Wertigkeit der EpCAM-Expression auf das Überleben.

Patienten mit Fernmetastasen zeigten im Vergleich zu Patienten ohne Fernmetastasen eine signifikant erhöhte EpCAM-Expression ( $p=0,0102$ ). Weiter erhöhte sich die EpCAM-Expression mit zunehmendem Tumorstadium ( $p=0,0254$ ). Als Prognosefaktoren für das Überleben wurden in der univariaten Cox-Regressionsanalyse der N-Status, die Ki-67-Expression und die WHO-Klassifikation und in der multivariaten Analyse der N-Status und die Tumorlokalisation (Darm vs. Pankreas vs. andere) identifiziert. Die Unterschiede beim Überleben von Patienten mit Immunreaktiver-Score-(IRS)-Werten für EpCAM  $\leq 4$  versus  $> 4$  waren je nach Testverfahren entweder als signifikant einzustufen oder verfehlten die Signifikanz nur knapp. Eine erhöhte EpCAM-Expression war mit einem geringeren Mortalitätsrisiko assoziiert (HR=0,561). Eine EpCAM-Gruppeneinteilung mit anderen IRS-Grenzwerten verschlechterte die prognostische Wertigkeit. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine niedrige EpCAM-Expression Patienten mit einem hohen Risiko für einen malignen Verlauf möglicherweise identifizieren und somit ggf. als Prognosemarker dienen kann.

- **Summary (english)**

Many carcinomas show an over expression of the (epithelial cell adhesion molecule) (HR=0,561) EpCAM. EpCAM is a cell adhesion molecule that occurs on the cell surface of various epithelial cells and mediates cell-cell contacts. The cell-cell adhesion

by EpCAM is less pronounced in comparison to other adhesion molecules. In addition to cell adhesion, the effects of the EpCAM include the induction of cell proliferation and the expression of carcinoma-associated proteins.

The aim of this thesis was to analyse EpCAM expression in gastroentero-pancreatic (GEP) neuroendocrine neoplasia (NEN) and the potential role of EpCAM as a prognostic indicator for malignancy in NEN. For this purpose, tissue samples from the primary tumour of 85 patients with NEN and additionally 14 lymph nodes and 9 distant metastases were immunohistochemically analysed for EpCAM and Ki-67 expression by means of tissue microarray (TMA). Subsequently, an analysis of the potential correlation of the immunohistochemical EpCAM data with the clinical and pathological parameters of the tumours were compared to each other. Special attention was paid to the potential prognostic value of EpCAM expression on survival.

Patients with distant metastasis showed a significant higher EpCAM-Expression ( $p=0.102$ ) compared to patients without distant metastasis. Furthermore, the EpCAM expression increases parallel to the tumor stage ( $p=0.0254$ ). The univariate Cox-regression analysis identified N-stage, Ki-67-expression and die WHO-classification and the multivariate analysis N-stage und tumor localisation (gut vs. pancreas vs. other) as prognostic factors for overall survival. The differences concerning survival of patients with immunoreactive score (IRS) values  $\leq 4$  versus  $> 4$  were significant or just missed statistical significance depending on the testing method. An enhanced EpCAM expression was associated with a lower mortality risk ( $HR=0,561$ ). An EpCAM grouping with different IRS limit values reduced the prognostic value. These results show that a low EpCAM expression may possibly identify patients with a high risk of malignant progression and thus may serve as a prognostic marker.

## • **Abkürzungsverzeichnis**

5-FU	5-Fluorouracil
5-HIES	5-Hydroxy-Indolessigsäure
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Complex-Methode

APUD	Amine Precursor Uptake and Decarboxylation
Aqua dest	destilliertes Wasser
CgA	Chromogranin A
CT	Computertomografie
DAB	Diaminobenzidin
EC	Enterochromaffine Zellen
EGF	epithelial growth factor
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule
EpEX	extrazelluläre Domäne von EpCAM
EpICD	intrazelluläre, signaltransduzierende Domäne von EpCAM
FHL2	four and a half LIM domain
GEP	Gastro-entero-pankreatisches System
HE	Hämatoxylin-Eosin-Lösung
Ig	Immunglobulin
IRS	immunreaktiver Score
IFN- $\alpha$	Interferon-alpha
Ki-67	Proliferationsmarker
LN	Lymphknoten
MANEC	adeno-neuroendokrine Karzinome
MEN1	Multiple endokrine Neoplasie Typ 1
MRT	Magnetresonanztomografie
pVHL	beim VHL-Syndrom mutierte Proteine
NEC	Neuroendokrine Karzinome
NEN	Neuroendokrine Neoplasien
NET	Neuroendokrine Tumoren
NF1	Neurofibromatose Typ 1
PBS	Phosphat-buffered-saline
PET	Positronenemissionstomografie
RT	Raumtemperatur
STX	Streptozotocin
TMA	Tissue-Microarray
VHL-Syndrom	Von Hippel-Lindau-Syndrom
WHO	World health organization

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Zusammenfassung (deutsch)</b> .....	<b>3</b>
<b>Summary (english)</b> .....	<b>4</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1 Neuroendokrine Neoplasien .....	10
1.1.1 Ätiologie/Epidemiologie .....	10
1.1.2 Historie .....	11
1.2 NEN-Klassifikationen .....	13
1.2.1 System nach Capella.....	13
1.2.2 WHO-Klassifikation.....	13
1.2.3 TNM-Stadieneinteilung und <i>Grading</i> .....	14
1.3 Ätiopathologie und Symptomatik neuroendokriner Neoplasien.....	17
1.4 NEN-Diagnostik .....	19
1.4.1 Spezifische Marker der histologischen Diagnostik.....	21
1.4.1.1 Synaptophysin .....	22
1.4.1.2 Chromogranin A (CgA) .....	22
1.4.1.3 Serotonin / 5-HIES.....	23
1.4.1.4 Weitere Tumormarker .....	23
1.4.2 Bildgebende Diagnostik.....	24
1.4.2.1 Sonografie .....	24
1.4.2.2 Endoskopie .....	24
1.4.2.3 CT und MRT .....	25
1.4.2.4 Somatostatin-Rezeptor-Szintigrafie .....	25
1.4.2.5 DOTATOC-Positronenemissionstomografie (PET)/CT .....	25
1.5 Metastasierung .....	26
1.6 Karzinoid-Syndrom .....	27
1.7 Therapie der GEP-NEN .....	27
1.7.1 Operative Therapie.....	29
1.7.2 Medikamentöse Therapie .....	30
1.8 Zielsetzung der Studie .....	33
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>34</b>
2.1 Geräte, Materialien, Software .....	34
2.2 Patienten.....	35

2.3 Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) .....	35
2.4 Ki-67 .....	37
2.5 Tissue-Microarrays (TMA) .....	38
2.5.1 Schnittherstellung .....	40
2.6 Immunhistochemie .....	41
2.6.1 Immunhistochemie EpCAM .....	41
2.6.2 Prinzip der Avidin-Biotin-Complex-Methode .....	42
2.6.3 Färbeprotokoll .....	43
2.6.4 Immunhistochemie Ki-67 .....	44
2.7 Auswertung der EpCAM- und Ki-67-Expression .....	45
2.8 Statistische Analyse .....	46
2.8.1 Cox-Regression .....	46
2.8.2 Univariate Cox-Regressionsanalyse .....	46
2.8.3 Multivariate Cox-Regressionsanalyse mit Interaktionsvariable .....	47
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>48</b>
3.1 Charakteristika der NET-Patienten .....	48
3.2 EpCAM-Expression .....	50
3.2.1 EpCAM-Expression in Abhängigkeit von der Metastasierung .....	50
3.2.2 EpCAM-Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium .....	54
3.2.3 EpCAM-Expression in Abhängigkeit von der WHO-Klassifikation .....	55
3.3 Einflussfaktoren auf die Überlebenszeit .....	56
3.3.1 Cox-Regressionsanalyse (univariate Analyse) .....	56
3.3.2 Multivariate Cox-Regressionsanalyse mit Interaktionsvariable .....	57
3.3.3 Einfluss der Metastasierung auf das Überleben .....	59
3.3.4 Einfluss des Geschlechts auf das Überleben .....	60
3.3.5 Einfluss des Alters auf das Überleben .....	60
3.3.6 Einfluss der Lokalisation der Tumoren .....	63
3.3.7 Einfluss von LN-Metastasen auf das Überleben .....	65
3.3.8 Einfluss von Fernmetastasen auf das Überleben .....	66
3.3.9 Einfluss der Tumorgöße auf das Überleben .....	67
3.3.10 Einfluss der Parameter der TNM-Klassifikation auf das Überleben .....	68
3.3.11 Einfluss der Ki-67-Expression auf das Überleben .....	71
3.3.12 Einfluss des WHO-Stadiums auf das Überleben .....	73
3.3.13 Einfluss des <i>Stagings</i> auf das Überleben .....	74

3.3.14 Einfluss der EpCAM-Expression auf das Überleben .....	75
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>81</b>
4.1 Methodisches Vorgehen .....	81
4.2 EpCAM-Expression in nicht-malignen und malignen Geweben .....	81
4.3 Zusammenhang zwischen der EpCAM-Expression und verschiedener Tumorparameter .....	82
4.4 Prognostische Bedeutung verschiedener Parameter für das Überleben .....	85
4.5 Bedeutung von EpCAM in der malignen Zelle .....	90
4.6 Schlussfolgerung und Ausblick .....	92
<b>5 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>93</b>
<b>6 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>7 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>115</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>116</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>127</b>

- 

- **Einleitung**

Das epitheliale Zell-Adhäsionsmolekül EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) wird in zahlreichen Tumoren überexprimiert, wobei das Ausmaß der Überexpression mit der Prognose und der Malignität des Tumors korreliert. Damit könnte EpCAM potentiell auch als Prognosemarker für den Krankheitsverlauf bei neuroendokrinen Neoplasien (NEN) geeignet sein.

- **Neuroendokrine Neoplasien**

- **Ätiologie/Epidemiologie**

NEN sind eine Gruppe von Tumoren des diffusen endokrinen Systems, deren Zellen Vesikel besitzen, in denen die zelltypspezifischen Marker Chromogranin A (CgA) und

Synaptophysin nachgewiesen werden können [Anlauf et al. 2011, Klöppel & Anlauf 2005, Klöppel et al. 2009]. Die Tumoren sind zu ca. 85 % im gastro-entero-pankreatischen System (GEP) lokalisiert und werden dort als GEP-NEN bezeichnet. Unterschieden werden Tumoren des Vorderdarms (foregut), des Mitteldarms (midgut) und des Hinterdarms (hindgut) [Böcker et al. 2004]. Das Verteilungsmuster der Tumoren ist variabel. Die häufigsten Lokalisationen der GEP-NEN sind mit ca. 50 % der Appendix und mit ca. 25 % der Dünndarm. Die restlichen 25 % verteilen sich auf das Rektum (15 %), den Magen (2 %), das Kolon (5 %), das Gallensystem und den Ösophagus (2 %) sowie auf das Pankreas (3 %) [Bale et al. 1991, Böcker et al. 2004, Oberndorfer 1907, Shan et al. 1998, Shepherd 1991].

Eine Besonderheit dieser langsam wachsenden Tumoren ist, dass sie ab einer Größe von ca. 2 cm zu 86–95 % Lymphknoten-(LN)- und zu 50 % Lebermetastasen bilden. Die bevorzugten Metastasierungsorte sind die regionären LN, sowie die Leber, die Lunge und das Skelett. Aufgrund des langsamen Wachstums am Entstehungsort führen NEN erst spät zu einer klinischen Symptomatik. Zu diesem Zeitpunkt können bei einem Drittel der Patienten bereits Metastasen in den regionären LN und in der Leber festgestellt werden. Daher werden NEN auch als „*cancer in slow motion*“ bezeichnet [Marshall & Bodnarchuk 1993]. Weiter zeichnen sich NEN in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation durch die Sekretion von Hormonen, wie Serotonin, Insulin, Glukagon, Gastrin, oder vasoaktive Substanzen wie Kalikrein, Histamin und adrenocorticotropes Hormon (ACTH) aus. Durch die erhöhte Sekretion solcher Hormone können charakteristische Syndrome (z. B. Karzinoid-Syndrom) entstehen. Teilweise werden die Tumoren nach der von ihnen sezernierten Substanz benannt (z. B. Gastrinome, VIPome (VIP = vasoaktives Intestinalpeptid), Glukanome und Insulinome).

NEN treten in der Regel sporadisch auf, können sich aber auch im Rahmen einer genetischen Prädisposition manifestieren.

Die NEN-Inzidenz, insbesondere des Gastrointestinaltraktes, ist in den vergangenen Jahren weltweit deutlich angestiegen [Modlin et al. 2008]. Als Ursachen gelten die verbesserten diagnostischen Möglichkeiten, ein besseres klinisches Bewusstsein und neue nationale und internationale Netzwerke [Dörffel & Wermke 2009, Ezziddin et al. 2006, Fuchs & Schepp 2008, Grenacher & Klauss 2009, Hassan et al. 2008, Plöckinger et al. 2009a, 2009b]. In Deutschland beträgt die jährliche Gesamtinzidenz

ca. 5,3 Erkrankungen pro 100.000 Personen. Die Häufigkeit schwankt in Abhängigkeit von der Lage des Primärtumors (z. B. Rektum-NEN 0,86/100.000 Jahr und Pankreas-NET 0,32/100.000 Jahr). Pankreas-NEN treten bei Frauen und Männer etwa gleich häufig auf, ihre Inzidenz steigt mit zunehmendem Lebensalter. Die Prävalenz beträgt weniger als 1/100.000, wobei Insulinome und Gastrinome 60 % und nicht-funktionelle Tumoren ca. 30 % der Neoplasien stellen.

- **Historie**

NEN wurden erstmals 1838 von Merling beschrieben [Klöppel & Heitz 1981]. Heidenhain identifizierte 1870 chromaffine Zellen des Dünndarms als Ursprungszellen dieses Tumortyps. Ranson fasste 1890 die Symptome Diarrhoe und Dyspnoe unter dem Begriff „Karzinoid-Syndrom“ zusammen. 1897 beschrieb Kulschitzky die Körnung der Tumorzellen als Charakteristikum der chromaffinen Zellen in den Lieberkühnschen Krypten. Ciaccio thematisierte 1906 in seiner Abhandlung *„Sur une nouvelle espèce cellulaire dans les glandes de Lieberkühn“* als Erster den endokrinen Ursprung der Tumoren. Oberndorfer führte 1907 den Begriff des „Karzinoid-Tumors“ für einen morphologisch differenzierten und im Vergleich zum klassischen Adenokarzinom weniger aggressiven Tumor ein [Zuetenhorst & Taal 2005]. 1914 entdeckte die Forschergruppe um Gosset und Masson die Eigenschaft der Argentaffinität, die zuvor bei enterochromaffinen Zellen (EC) nachgewiesen wurde, auch bei Karzinoiden. Im Jahr 1924 wurde eine identische Argentaffinität in den EC-Zellen der Lieberkühnschen Drüsen des Dünndarms und den Karzinoiden entdeckt. Man schloss daraus, dass die Karzinoid-Zellen von EC an der Basis der Lieberkühn-Krypten abstammen [Tiedeken 1983]. 1930 beschrieb Cassidy, geleitet von Beobachtungen an einem Patienten mit *„phänomenaler Gesichtsrötung, die bei Aufregung oder Nahrungsaufnahme verstärkt wird“* das Symptom eines Flush. 1931 wurde das Karzinoid-Syndrom mit episodischen Flush-Anfällen, Diarrhoen, kollikartigen Leibscherzen, asthmatischen Beschwerden, Tachykardien, Hautveränderungen (Dauerzyanose, Teleangiektasien, pellagraartige Dermatosen, Hyperpigmentierungen) und einer möglichen Endokardfibrose detailliert beschrieben [Cassidy 1930]. Feyrter charakterisierte die *„hellen Zellen“* im Darm anhand ihrer typischen Granulierung (argentaffine Zellen) und schloss auf ihren endokrinen Ursprung. Er erkannte, dass die Dünndarm-Karzinoide nur einen Teil eines peripheren endokrinen Systems darstellen und leitete daraus das *„Helle-Zellen-System“* ab [Feyrter 1938]. 1936 isolierten Feyrter und Unna mit Serotonin einen

vasoaktiven Stoff aus einem Appendix-Karzinoid, der 1948 auch von Rapport et al. im Serum nachgewiesen wurde. Der Nachweis, dass das Serotonin von EC gebildet wird, gelang 1952 Erspamer und Asero. Zwei Jahre später wurde Serotonin auch in Dünndarm-Karzinoiden nachgewiesen [Lembeck 1953]. 1955 wurde ein Abbauprodukt des Serotonins, die 5-Hydroxy-Indolessigsäure (5-HIES), im Urin entdeckt [Page et al. 1955]. 1963 fassten Williams und Sandler Tumoren mit vergleichbaren klinischen und biochemischen Eigenschaften in Gruppen zusammen und klassifizierten diese in Entitäten des Vorder-, Mittel- und Hinterdarms.

Pearse prägte 1969 den Begriff des *Amine Precursor Uptake and Decarboxylation* (APUD)-Zellsystems. Die Zellen dieses Systems lassen sich entwicklungsgeschichtlich auf eine gemeinsame pluripotente Stammzelle des Neuroektoderms zurückführen. Daher kommen NEN im Zentralnervensystem und in peripheren Organen vor. 1980 fasste die Weltgesundheitsorganisation (world health organization, WHO) benigne, maligne, funktionelle und nicht-funktionelle Tumoren als „*Karzinoid*“ zusammen [Solcia et al. 1981]. Capella et al. ersetzten 1994 den Begriff „*Karzinoid*“ durch „*Neuroendokrinen Tumor (NET)*“ und klassifizierten die Tumoren nach ihrer Malignität [Yalow & Berson 1960]. Die NET-Klassifikation der WHO aus dem Jahre 2000 führte den Begriff des NET bzw. des neuroendokrinen Karzinoms (NEC) ein und teilte die Tumoren in hoch differenzierte NET, in hochdifferenzierte NEC und in schlecht differenzierte NEC ein [Höckfelt et al. 1980].

Die nächste Novellierung der WHO-Klassifikation der GEP-NEN erfolgte 2010 auf der Basis der These, dass alle GEP-NEN mit hoher Wahrscheinlichkeit maligne sind, sich jedoch klar in ihrer Möglichkeit zur Metastasenbildung unterscheiden. Alle gut differenzierten NEN werden als NET G1 (entspricht dem Karzinoid) oder G2 beschrieben. Schlecht differenzierte NEN werden als NEC G3 geführt und in klein- und großzellige Karzinome differenziert. Eine Sonderstellung nehmen gemischte adeno-neuroendokrine Karzinome (MANEC) sowie hyper- und präneoplastische Läsionen ein [Krejs 1987].

- **NEN-Klassifikationen**

- **System nach Capella**

Aufgrund der uneinheitlichen Nomenklatur und der Schwierigkeit, das biologische Verhalten der Tumoren abzuschätzen, schlugen Capella et al. 1994 vor, endokrine Tumoren der Lunge, des Pankreas und des Gastrointestinaltraktes als NET und bei Metastasierung bzw. dem Vorliegen eindeutiger Malignitätskriterien als NEC zu bezeichnen. Die Unterteilung der Tumoren beruht in diesem System auf drei Kriterien:

- **Ursprungsort:** Dabei wird der Gastrointestinaltrakt in einzelne Abschnitte untergliedert.
- **Dignitätsgruppen:** Die Unterteilung erfolgt auf dem Boden der histologischen Differenzierung, der Invasion in Nachbarorgane, der Metastasierung und der Tumorgroße [Klöpffel et al. 1996]:  
Stadium 1) benignes Verhalten,  
Stadium 2) benignes oder niedrig malignes Verhalten,  
Stadium 3) malignes Verhalten und  
Stadium 4) hochgradig malignes Verhalten (*mixed exocrine-endocrine*)
- **Einteilung in „funktionelle“ und „nicht-funktionelle“ NET:** Kriterium ist das Vorhandensein / Fehlen einer aktiven Hormonproduktion in Blut- bzw. Urinproben, die ggf. mit einem typischen klinischen Syndrom einhergeht [Arnold & Frank 1996].

- **WHO-Klassifikation**

2000 führte die WHO für NET vom epithelialen Typ eine revidierte Klassifikation zur Einteilung und Beschreibung der Tumoren ein [Capella et al. 1994], wobei ebenfalls die Begriffe NET bzw. NEC gewählt wurden. Diese Klassifikation (s. Tab. 1) unterteilt die Tumoren unter Berücksichtigung der Tumorlokalisation, der Tumorgroße, der Hormonproduktion, des histologischen Gradings, des Proliferationsindex und der Angioinvasion in vier Gruppen [Klöpffel et al. 2004, Ramage et al. 2005].

**Tab. 1: Klassifikation neuroendokriner Tumoren (NET)**

<b>Hochdifferenzierter neuroendokriner Tumor</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• hormonell aktiv</li><li>• hormonell inaktiv</li></ul>
<b>Hochdifferenziertes neuroendokrines Karzinom</b> <ul style="list-style-type: none"><li>• hormonell aktiv</li></ul>

• hormonell inaktiv
<b>Niedrigdifferenziertes neuroendokrines (kleinzelliges) Karzinom</b>
<b>Gemischter exokriner-endokriner Tumor</b>
<b>Tumorähnliche Läsion (Tumorlet)</b>

Quelle: [Capella et al. 2000, DeLellis et al. 2004]

2010 erschien eine überarbeitete WHO-Klassifikation, wobei die grundlegenden Kriterien (z. B. Differenzierung, Proliferation) der vorherigen WHO-Klassifikation beibehalten wurden. Die aktuelle WHO-Klassifikation geht davon aus, dass alle GEP-NEN maligne sind und sich lediglich hinsichtlich ihrer Metastasierungswahrscheinlichkeit unterscheiden. Gut differenzierte NEN werden unter NET G1 oder G2 und schlecht differenzierte NEN unter NEC G3 zusammengefasst. Bei den NEC G3 werden darüber hinaus kleinzellige und großzellige Tumoren unterschieden. Die Tumorlokalisation, -größe, -ausbreitung und Angioinvasion wurde in die TNM-Klassifikation verlagert, die die Klassifikation ergänzt. Hinzu kommt ein Grading-System, das die prognostisch-therapeutische Wertung verbessert. Ausgenommen hiervon sind MANEC sowie hyperplastische und präneoplastische Läsionen.

• **TNM-Stadieneinteilung und Grading**

2006 wurde auf der Basis Leitlinien der „European Neuroendocrine Tumor Society“ (ENETS) zur NET-Risikoeinschätzung auf der Konsensus-Konferenz eine TNM-Klassifikation für „foregut“ GEP-NET erstellt. Die Einteilung für „midgut“ und „hindgut“ Tumoren erfolgte 2007. Letztere bezieht den Tumorzelltyp, die funktionale Aktivität und den genetischen Hintergrund nicht mit ein [Rindi et al. 2006, 2007]. Die TNM-Stadieneinteilung für kolorektale NET ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tab. 2: TNM-Stadieneinteilung für kolorektale Neuroendokrine Tumoren (NET)**

Parameter	Ausprägung	Charakteristikum
Tumor	TX	Primärtumor nicht beurteilbar
	T0	kein Hinweis auf Primärtumor
	T1	Tumor infiltriert Mukosa oder Submukosa. T1a: <1 cm; T1b: 1–2 cm
	T2	Tumor infiltriert Muscularis propria oder ist >2 cm

	T3	Tumor infiltriert Subserosa/perikolisches oder perirektales Fettgewebe
	T4	Tumor infiltriert andere Organe/Strukturen und/oder perforiert Peritoneum Zusatz (m) für multiple Tumoren
Lymphknoten (LN)	NX N0 N1	regionaler LN-Status nicht beurteilbar keine regionalen LN befallen regionale LN-Metastasen: Fernmetastasen
Fernmetastasen	MX M0 M1	Fernmetastasen-Status nicht beurteilbar keine Fernmetastasen Fernmetastasen

Quelle: modifiziert nach Rindi et al. (2007)

Zudem wurden ein Staging- (s. Tab. 3) und ein Grading-System (s. Tab. 4) eingeführt. Gut differenzierte Tumoren werden durch das Grading in die Grade G1 und G2, schlecht differenzierte Tumoren in G3 eingeordnet.

**Tab. 3: Staging für neuroendokrine Tumoren (NET) von Kolon und Rektum**

Stadium	T: Primärtumor	N: regionale Lymphknoten	M: Fernmetastasen
Ia	T1a	N0	M0
Ib	T1b	N0	M0
IIa	T2	N0	M0
IIb	T3	N0	M0
IIIa	T4	N0	M0
IIb	Jedes T	N1	M0
IV	Jedes T	Jedes N	M1

Quelle: Modifiziert nach Rindi et al. (2007)

**Tab. 4: Grading für gastro-entero-pankreatische neuroendokrine Tumoren (GEP-NET) aus Ileum, Appendix, Kolon und Rektum**

Grade	Mitoserate (10 HPF)	Ki-67-Index (%)
G1	<2	≤2
G2	2–20	3–20
G3	>20	>20

HPF = Hauptgesichtsfeld (*high power field*); Ki-67 = Proliferationsmarker

Quelle: Modifiziert nach Rindi et al. (2007)

Aufgrund der deutlichen Schwächen des Systems bei Tumoren in fortgeschrittenem Stadium mit Metastasierung wurde 2010 eine verbesserte WHO-Klassifikation veröffentlicht, die das Grading und Staging der NEN separat aufführt (s. Tab. 5). Außerdem wurde eine Einteilung in NET G1, NET G2 und NEC G3 vorgenommen [Klimstra et al. 2010].

**Tab. 5: WHO- (2010) und ENETS-Klassifikation für gastro-entero-pankreatische neuroendokrine Tumoren (GEP-NET) und Pankreas-NET / Grading System nach ENETS (2006/07) [Bubendorf et al. 2001]**

<b>Grading</b>	<b>GEP-NET (ENETS)*</b>	<b>GEP-NET (WHO 2010)**</b>	<b>Pankreas***</b>
<i>Low Grade</i>	neuroendokriner Tumor Grad 1 (G1)	neuroendokrine Neoplasie Grad 1 (G1)	gut differenzierte endokrine Neoplasie
<i>Intermediate Grade</i>	neuroendokriner Tumor Grad 2 (G2)	neuroendokrine Neoplasie Grad 2 (G2)	gut differenzierte endokrine Neoplasie
<i>High Grade</i>	neuroendokrines Karzinom Grad 3 (G3) (kleinzelliges Karzinom)	neuroendokrines Karzinom Grad 3 (G3) (kleinzelliges Karzinom)	gering differenzierte endokrine Neoplasie (kleinzelliges Karzinom)
	neuroendokrines Karzinom Grad 3 (G3) (großzelliges Karzinom)	neuroendokrines Karzinom Grad 3 (G3) (großzelliges Karzinom)	gering differenzierte endokrine Neoplasie (großzelliges Karzinom)
	<b>GEP-NET (ENETS)* (WHO 2010)**</b>		<b>Pankreas***</b>
<i>Low Grade</i>	< 2 Mitosen/10 HPF Ki-67-Index < 3 %		< 2 Mitosen/50 HPF keine Nekrosen
<i>Intermediate Grade</i>	2-20 Mitosen/10 HPF Ki-67-Index 3–20 %		2–50 Mitosen/50 HPF Nekrosen
<i>High Grade</i>	> 20 Mitosen / 10 HPF Ki-67-Index 3–20 %		> 50 Mitosen/50 H

ENETS: „European Neuroendocrine Tumor Society“; HPF = Hauptgesichtsfeld (high power field); Ki-67 = Proliferationsmarker; WHO = World Health Organization

Quellen: \* Klöppel et al. (2010); \*\* Bosman et al. (2010); \*\*\* Hochwald et al. (2002)

## • Ätiopathologie und Symptomatik neuroendokriner Neoplasien

GEP-NEN gehen von disseminierten neuroendokrinen Zellen aus, die von Feyrter [1938] als „Helle Zellen“ und von Pearse [1969] als „APUD-Zellen“ bezeichnet wurden. Aufgrund ihrer nahen Verwandtschaft mit neuronalen Zellen werden die Tumoren als neuroendokrin bezeichnet. Diese Annahme wird durch die Expression neuronaler

Markerproteine wie Synaptophysin und der Neuronen-spezifischen-Enolase (NSE) bestätigt. Alle neuroendokrinen Zellen besitzen kleine (synaptische) und große (neurosekretorische) Vesikel (Granula), in denen Monoamine und/oder Peptidhormone gespeichert und stimulusabhängig freigesetzt werden. Somit beinhaltet der Begriff „neuroendokrin“ folgende Charakteristika:

- Synthese oder Aufnahme von Peptiden/Monoaminen
- Speicherung in sekretorischen Vesikeln
- stimulusabhängige Sekretion und
- rezeptorvermittelte Wirksamkeit.

Die Diagnose einer NEN erfolgt über den Nachweis von CgA und Synaptophysin. CgA gilt in der Diagnostik als spezifischer Marker, wobei auch CgA-negative NEN existieren. Auch Synaptophysin ist ein neuroendokriner Marker mit hoher Sensitivität und Spezifität, der sich für die Routinediagnostik gut eignet.

Die meisten NEN treten sporadisch auf, wobei auch eine erbliche Prädisposition vorliegen kann. Zu Letzteren zählen die Multiple endokrine Neoplasie Typ 1 (MEN1), das von Hippel-Lindau-(VHL)-Syndrom und die Neurofibromatose Typ 1 (NF1) [Modlin et al. 2008, Turaga & Kvols 2011].

Das MEN1-Syndrom ist eine seltene, autosomal-dominant vererbte Erkrankung. Dabei führen Mutationen im MEN1-Gen (Chromosom 11q13) zu einem Mangel des Tumorsuppressors Menin [Kulke & Mayer 1999]. Die Erkrankung ist durch eine inaktivierende Mutation des MEN1-Gens bedingt. Sind beide Allele von einer solchen Mutation betroffen, entstehen multiple NEN in der Hypophyse, der Nebenschilddrüse, dem Pankreas, der Haut, dem Fettgewebe, der Nebennierenrinde sowie im Magen-Darm-Trakt [Böcker et al. 2004, Oberndorfer 1907, Shan et al. 1998, Shepherd 1991]. Laut Literatur treten ca. 80 % der Pankreas-NET und ca. 30 % der Gastrin-produzierenden NET im Rahmen einer MEN1-Erkrankung auf [Öberg 1996]. Das MEN1-Syndrom und ein Großteil der daraus resultierenden Tumoren entstehen aus diffusen neuroendokrinen Zellen (APUD-Zellen) [Böcker et al. 2004]. Die Bandbreite der Veränderung der Zellen und Drüsen reicht von Hyperplasien über Adenome bis hin zu Karzinomen. Das klinische Erscheinungsbild und die damit einhergehenden Beschwerden der MEN1-Erkrankung sind variabel und hängen vom Manifestationsort ab. Die meisten Tumoren zeichnen sich durch eine Hormon-Hypersekretion mit daraus folgenden typischen Symptomen aus. Die Inzidenz der MEN1-Erkrankung und ihrer

assoziierten Erscheinungsbilder beträgt ca. 1–10:100.000, wobei beide Geschlechter gleich häufig betroffen sind. Langzeitstudien belegen das Fehlen einer geografischen oder ethnischen Präferenz. Die altersbezogene Penetranz der Erkrankung beträgt mit 20 Jahren 52 % und mit 40 Jahren 98 % [Bassett et al. 1998]. Nicht jeder MEN1-Genträger entwickelt das volle Krankheitsbild.

Auch das VHL-Syndrom ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die auf Mutationen im VHL-Tumorsuppressor-Gen (Chromosom 3p25-26) beruht [Lerman 2001]. Die mutierten Proteine, pVHL30 bzw. pVHL19, werden als pVHL zusammengefasst [Blankenship et al. 1999, Iliopoulos et al. 1998, Schoenfeld et al. 1998]. Laut Literatur beträgt die Prävalenz der Erkrankung ca. 1:36.000 bis 1:85.000 [Gimm et al. 2004]. Betroffen sind hauptsächlich sezernierende Zellen exokriner und endokriner Organe, parenchymatöse Zellen viszeraler Organe, Epithelzellen des Verdauungs-, Urogenital- und Respirationstrakts sowie Makrophagen, Neuronen, Herzmuskelzellen und Lymphozyten [Corless et al. 1997, Los et al. 1996, Sakashita et al. 1999]. Die Expression von pVHL ist in fötalen und adulten Geweben ubiquitär [Latif et al. 1993]. Eine deutliche Überexpression des pVHL tritt in den Zellen des Gehirns, des Rückenmarks, der Augen, der sensorischen Ganglien, des Urogenitaltrakts und des Bronchialepithels auf [Richards et al. 1996]. Das durch eine homologe Mutation im VHL-Tumorsuppressorgen entstehende klinische Bild umfasst u. a. Nierenzellkarzinome, Phäochromozytome und Hämangioblastome im Cerebellum.

Die NF1 ist ebenfalls eine autosomal-dominante Erbkrankheit mit einer Prävalenz von ca. 1:30.00 bis 1:40.000 [Huson & Hughes 1994]. In 50 % der Fälle tritt die Erkrankung sporadisch auf. Die Besonderheit der NF1 liegt darin, dass bei einer Penetranz von 100 % unterschiedliche klinische Erscheinungsbilder vorliegen können [Gutmann et al. 1997, Stumpf et al. 1988]. Die Erkrankung wird durch eine Mutation des NF1-Tumorsuppressor-Gens (Chromosom 17q11.2) verursacht [Cawthon et al. 1990, Viskochil et al. 1990]. Die klinische Diagnose wird gestellt, wenn die Patienten mindestens zwei der krankheitstypischen Merkmale aufweisen:

- sechs oder mehr sogenannte Café-au-lait Flecken
- zwei oder mehr Neurofibrome
- sommersprossenartige Pigmentierung der Achselhöhlen und/oder der Leistengegend
- ein Optikusgliom

- mindestens zwei Irishamartome (Lisch-Knoten)
- mindestens ein Verwandter ersten Grades mit der Diagnose einer NF1 [Cawthon et al. 1990, Viskochil et al. 1990].

Das Karzinoid-Syndrom entsteht durch Serotonin-produzierende Karzinoid-Tumoren meist im Gastrointestinaltrakt [Modlin et al. 2005]. Ein Karzinoid führt aber in nur ca. 10 % der Fälle zu einem Karzinoid-Syndrom [Koopmans et al. 2005]. Das Hauptmerkmal des Karzinoid-Syndroms ist der Flush, der durch gastrointestinale Hypermobilität mit Oberbauchbeschwerden und Diarrhoe, anfallsartige Rötung des Gesichtes, des Nackens und der oberen Rumpfpforten und einer expiratorischen Stenoseatmung durch asthmaähnliche Bronchialkonstruktionen gekennzeichnet ist. Als Spätsyndrom kann beim Karzinoid-Syndrom eine Rechtsherz-Endokardfibrose (Hedinger-Syndrom) mit Pulmonalstenose sowie Trikuspidalinsuffizienz auftreten [Bhattacharyya et al. 2008, Robiolio et al. 1995].

- **NEN-Diagnostik**

Die Basisdiagnostik der NEN beinhaltet die Bestimmung der neuroendokrinen Marker Synaptophysin und CgA und des Proliferationsmarkers Ki-67 [Page et al. 1955]. Die erweiterte optionale Diagnostik zur biologischen Einordnung des Tumors umfasst den Nachweis von Hormonen, der sich an der Lokalisation des Tumors und der klinischen Fragestellung orientiert [Page et al. 1955]. Der Analyse von Transkriptionsfaktoren ist hilfreich für die Lokalisationsdiagnostik bei unklarem Primarius. Der immunhistochemische Nachweis des Somatostatin-Rezeptors 2A ist eine zusätzliche Option für die klinische Diagnostik. Gleichzeitig können Entitäten identifiziert werden, die sich für eine Therapie mit Somatostatin-Rezeptors-2A-Antagonisten eignen [Page et al. 1955, Pearse 1969]. Eine exakte NEN-Klassifikation nach den Kriterien der WHO ist in vielen Fällen erst am Resektionspräparat möglich.

Die hereditären Entitäten (MEN1, NF1, VHL-Syndrom) können durch die Analyse des klinischen Bildes und spezifischer Keimbahnmutation identifiziert werden [Feyrter 1938, Feyrter & Unna 1936, Marshall & Bodnarchuk 1993].

GEP-NEN werden häufig initial nicht erkannt. Oft vergehen Jahre bis zur endgültigen Diagnose. Dabei ist eine Verdachtsdiagnose meist schon nach einer sorgfältigen Erhebung der Krankengeschichte und einer körperlichen Untersuchung des Patienten

ohne großen technischen Aufwand möglich. Wesentlich für die Diagnose ist die Kenntnis der einzelnen Krankheitsbilder. Zu den charakteristischen Merkmalen zählen

- häufige Durchfälle, die auch nachts nicht aufhören und über Wochen persistieren
- Rötungen in der oberen Körperhälfte, v. a. Gesicht, die sich besonders nach Alkoholeinnahme verstärken (Flush).

Die Kombination von ausgeprägten Durchfällen und Flush wird als Karzinoid-Syndrom bezeichnet. In diesen Fällen liegt der Primarius meist im Bereich des Dünndarms und der Lunge, seltener in der Bauspeicheldrüse oder im Enddarm. Bewusstseins Einschränkungen können Ausdruck einer gesteigerten Freisetzung von Insulin und einer damit verbundenen Unterzuckerung sein. Entstehungsort dieser NEN ist praktisch immer das Pankreas. Auch ausgeprägte Magenbeschwerden weisen auf eine Pankreas-NEN hin. Ursache ist vermehrt freigesetztes Gastrin (Gastrinom), das über die Stimulation der Freisetzung von Salzsäure im Magen zu ausgedehnten Schleimhautgeschwüren im Bereich des Magens, Zwölffingerdarms und der Speiseröhre führen kann.

Bei der körperlichen Untersuchung ist die Leber, vor allem bei bereits vorliegenden Tumorabsiedlungen, häufig vergrößert. Seltener kann der Arzt einen größeren Darmtumor tasten. Bei Tumoren im Kopfbereich des Pankreas kommt es im fortgeschrittenen Stadium zu einer Gelbsucht. Patienten mit ausgeprägtem Karzinoid-Syndrom zeigen in bis zu einem Drittel der Fälle krankhafte Geräusche im Bereich der Herzklappen.

Bei der histopathologischen Untersuchung des Tumorgewebes werden gezielt Tumormarker überprüft (z. B. Synaptophysin, CgA, Ki-67). Trotz ihrer Heterogenität produzieren und sezernieren GEP-NEN identische, immunhistochemisch nachweisbare Substanzen (CgA, Synaptophysin, Neuronen-spezifische Enolase (NSE), Protein Gene Product 9.5 (PGP9.5) [Öberg & Jelic 2008, Williams 2007]. Histologisch präsentieren sich die NEN des Kolons meist als niedrig differenzierte NEC, die durch die Expression von Synaptophysin und zytosolischen Markern der neuroendokrinen Differenzierung (Protein Gene Product 9.5) charakterisiert sind. Dagegen sind die NEN des Rektums meist hochdifferenziert [Klöpffel & Anlauf 2005, Plöckinger 2004]. GEP-NEN des Kolons zeichnen sich durch das Vorhandensein von EC-Zellen aus und GEP-NEN des Rektums durch das Auftreten von L-Zellen. Diese Zuordnung wird durch keinen klinischen Zusammenhang bestätigt, jedoch existieren

Zelltyp-spezifische Marker. Bei den rektalen L-Zell-Tumoren sind dies Glukagon, Glicentin, Peptid YY und pankreatisches Polypeptid. Die EC-Zell-Tumoren zeichnen sich in einigen Fällen durch eine Serotonin-Produktion im Kolon aus [Plöckinger 2004, Ramage et al. 2008].

Einige Tumormarker sind auch in Körperflüssigkeiten nachweisbar. Je nach Lokalisation des NEN (Mitteldarmtumor, Bronchialsystem) ist eine Bestimmung von 5-HIES im Urin sinnvoll. Bei allen NEN mit unsicherer Tumorausdehnung sollte das CgA im Blut bestimmt werden.

Als bildgebende Verfahren eignen sich Ultraschalluntersuchungen sowie gezielte Magen- und Darmspiegelungen. Die Somatostatin-Rezeptor-Szintigrafie (Octreoscan) kann die durch die mikroskopische Untersuchung und Ultraschallbefunde gestellte Diagnose sichern. Darüber hinaus sollten in Abhängigkeit der Erfahrungen der behandelnden Zentren bildgebende Verfahren (Computertomografie (CT), Magnetresonanztomografie (MRT)) genutzt werden.

- **Spezifische Marker der histologischen Diagnostik**

Die primäre Diagnostik der NEN erfolgt biochemisch durch den Nachweis von Tumormarkern im Plasma. Darüber hinaus bilden Tumormarker den Verlauf der Krankheit und das Verhalten des Tumors auf eine Therapie ab und dienen als Prognoseparameter [Blankenship et al. 1999].

Tumormarker werden in spezifische und allgemeine Marker unterteilt. Spezifische Marker der funktionell aktiven NEN sind die vom Tumor autonom sekretierten Hormone. Allgemeine Tumormarker sind durch labor- und immunhistochemische Testverfahren unabhängig von der Funktionalität und Lokalisation bei allen NEN nachweisbar. Als wichtigste Vertreter dieser Gruppe gelten CgA, Synaptophysin, das Pankreatische Polypeptid, die Beta-Untereinheit des humanen Choriongonadotropin ( $\beta$ -HCG) und die Neuronen-spezifische Enolase (NSE) [Gimm et al. 2004].

- **Synaptophysin**

Synaptophysin kommt in Neuronen in intrazellulären präsynaptischen Vesikeln als transmembranäres Protein vor. Das ubiquitäre Vorkommen ist unabhängig von sekretorischen Granula. Daher gilt Synaptophysin ergänzend zu CgA als sensitiver

und spezifischer Marker für NET [Kasprzak et al. 2007]. In der Diagnostik wird Synaptophysin genutzt, um CgA-negative NET zu identifizieren [Williams 2007].

- **Chromogranin A (CgA)**

Das saure, wasserlösliche Glykoprotein CgA ist der Hauptvertreter der Chromogranin-Familie. In neuroendokrinen Zellen wird CgA mit weiteren Vertretern der Chromogranin/Sekretogranin-Familie, Hormonen, biogenen Aminen und Neurotransmittern in optisch dichten Vesikeln gespeichert und nach entsprechenden Stimuli in die Zirkulation abgegeben [Taupenot et al. 2003]. Zu den Aufgaben der Chromogranine zählen die Steuerung des vesikulären Transports, der partiellen autoproteolytischen Spaltung und der Exozytose granulärer Inhaltsstoffe [Taupenot et al. 2003]. Das CgA ist ein Proprotein mit mehreren Spaltstellen aus zwei basischen Aminosäuren. Durch Spaltung an diesen Stellen werden gewebespezifische, biologisch aktive Proteasen (z. B. Pankreastatin, Vasostatin, Parastatin, Chromostatin) generiert. Die sekretierten Proteasen wirken auto-, para- und endokrin. Zu ihren Funktionen zählen die Anhebung des Blutglukosespiegels (Pankreastatin), die Vasokonstriktion (Vasostatin I und II) und antibakterielle Effekte (Prochromacin, Chromacin I und II, Vasostatin) [Taupenot et al. 2003].

Die ubiquitäre Expression in neuroendokrinen Geweben und die gemeinsame Sekretion mit anderen Hormonen macht CgA zu einem geeigneten Gewebe- und Serummarker für NEN. Jedoch korrelieren die Ergebnisse der Immunhistochemie und der Serum-Plasmadiagnostik bei GEP-NEN nicht zwangsläufig [Gregorc et al. 2007]. CgA wird aufgrund seiner hohen Sensitivität und Spezifität sowohl als immunhistochemischer Breitbandmarker zur Identifizierung neuroendokriner Zellen als auch in der serologischen Diagnostik und therapeutischen Evaluation von GEP-NEN eingesetzt [Kasprzak et al. 2007]. Die Quantifizierung weiterer Granine und deren Derivate kann diagnostisch sinnvoll sein und wird bei verschiedenen Tumorentitäten (z. B. Prolaktinom, pankreatischer Inselzell-Tumor, kleinzelliges Bronchialkarzinom) genutzt [Taupenot et al. 2003].

Damit hohe CgA-Werte nicht irrtümlich als NEN-Nachweis gedeutet werden, sollten potentiell auftretende Nieren- und Leberbeeinträchtigungen, chronisch atrophischen Gastritiden, chronischen Darminfektionen, enterochromaffin-ähnlichen-Zell-(ECL)-Hyperplasien, primären parathyreoidalen Hyperplasien, thyreoidalen C-Zell-

Hyperplasien, physischer Stress und Einnahme von Protonenpumpen-Hemmern berücksichtigt werden. In solchen Fällen differenziert ein Anstieg der CgA-Konzentration nicht zuverlässig zwischen einer neuroendokrinen Hyperplasie, einem Adenom oder einem Karzinom [Campana et al. 2007, Eriksson et al. 2000, Gregorc et al. 2007, Namwongprom et al. 2008, Taupenot et al. 2003].

- **Serotonin / 5-HIES**

Serotonin und sein Metabolit 5-HIES sind spezifische Marker für hauptsächlich im midgut lokalisierte GEP-NEN. Die Spezifität liegt bei fast 100 %, die Sensitivität bei 35,1 % [Bajetta et al. 1999]. Die Serotonin-Bestimmung im Serum ist schwierig, da es in Thrombozyten gespeichert wird und eine Freisetzung bei der Blutentnahme zu falsch hohen Werten führen kann. Aus diesem Grund hat sich in der klinischen Routine die Bestimmung des Metaboliten 5-HIES im 24-Stunden-Sammelurin durchgesetzt [Arnold et al. 2004]. Serotonin- bzw. 5-HIES-Konzentrationen sind bei GEP-NEN des foregut und hindgut häufig geringer als bei GEP-NEN des midgut. Die 5-HIES-Werte korrelieren beim midgut GEP-NEN nicht mit der Schwere des Karzinoid-Syndroms oder dem Ausmaß der Metastasierung [Onaitis et al. 2000, Shebani et al. 1999].

- **Weitere Tumormarker**

Neurokinin A gehört zu den Tachykininen. Das Peptid ist vor allem bei Patienten mit GEP-NEN des midgut erhöht. Die klassischen GEP-NEN des midgut speichern und sezernieren Neurokinin zusammen mit Substanz P. Beide Substanzen beeinflussen die gastrointestinale Motilität, Vasodilatation und Flush-Entwicklung, sowie die Lymphozyten- und Mastzelldegranulation.

Rektale Karzinoide führen in 80–100 % der Fälle zu einem Anstieg der Prostata-spezifischen sauren Phosphatase. Zur Diagnostik eines rektalen NEN eignet sich auch die Bestimmung der Beta-Untereinheit des humanen Choriongonadotropin ( $\beta$ -HCG), Enteroglukagon- und pankreatischem Polypeptid [Faiss et al. 1997].

- **Bildgebende Diagnostik**

Aufgrund der Heterogenität und der geringen, jedoch deutlich steigenden Inzidenz der GEP-NEN fehlt derzeit ein evidenzbasierter und standardisierter Algorithmus für die

diagnostische Bildgebung. Da die Tumorlokalisation und -ausdehnung wichtig für die Therapieentscheidung sind, ist eine gute Bildgebung unabdingbar. Die Auswahl des Bildverfahrens richtet sich nach der Zielsetzung (z. B. Primärtumorsuche, Ausdehnungsdiagnostik, Metastasensuche) [Faiss et al. 1997].

- **Sonografie**

Die abdominelle Sonografie ist eine Routineuntersuchung im klinischen Alltag. Die Sensitivität beträgt jedoch lediglich 50–60 % und ist untersucherabhängig.

Die Sonografie spielt bei der Gewinnung von Gewebeproben (z. B. bei der Leberbiopsie) eine besondere Rolle. Die Identifizierung von hypervaskularisierten Leberfiliae wird durch den Einsatz von Kontrastmittel erleichtert.

Zur Detektion kleiner pankreatischer Läsionen hat sich der endoskopische Ultraschall bewährt. Im Rahmen der präoperativen Diagnostik können mit Hilfe eines endoanalen oder rektalen Ultraschalls Informationen über die Tumorgöße, Tiefe der Invasion und über die pararektalen LN gewonnen werden. Die endoskopische Sonografie zeigt eine Sensitivität von bis zu 90 % [Arnold 2005, Faiss et al. 1997].

- **Endoskopie**

Im klinischen Alltag werden rektale NEN in der Regel endoskopisch diagnostiziert. Im Anschluss wird die Gewebeprobe zur Diagnosesicherung histologisch aufgearbeitet. Bei rektalen NEN liegen viele Läsionen als Polypen vor, sodass eine histologische Untersuchung unumgänglich ist. In jedem Fall sollte der Untersucher ein besonderes Augenmerk auf ein möglicherweise parallel vorhandenes Karzinom legen [Faiss et al. 1997].

Auch im Rahmen der Diagnose von NEN des Magens ist die Endoskopie ein etabliertes und sensitives Instrument. Aufgrund der geringen Sensitivität spielt die Endoskopie bei GEP-NEN des midgut aber eine untergeordnete Rolle. Eine Push and Pull Intestinoskopie oder eine Kapselendoskopie wird nur in Ausnahmesituationen durchgeführt.

- **CT und MRT**

Im Vergleich zum Ultraschall stellen CT und MRT sensitivere Methoden bei der Primärdiagnostik und Metastasensuche dar. Mithilfe einer CT-Untersuchung mit Kontrastmittelunterstützung und in Mehrschichttechnik kann bei GEP-NEN die Größe des Primärtumors und ein Staging im Bereich des Abdomens, des Beckenbodens und der mesenterialen LN durchgeführt werden.

Die MRT-Diagnostik wird zur Bestimmung der Tumorausdehnung in pelvinen Strukturen genutzt. In der Pankreas-Diagnostik hat sich die Kombination aus MR-Cholangiopankreatikografie (MRCP) und MRT bewährt. Die Sensitivität der CT- und MRT-Untersuchungen beträgt ca. 80 % [Arnold 2005, Faiss et al. 1997].

- **Somatostatin-Rezeptor-Szintigrafie**

Ein wichtiger Baustein der GEP-NEN-Diagnostik ist zudem die Somatostatin-Rezeptor-Szintigrafie. Von den fünf Somatostatin-Rezeptor-Typen (SSTR1–5) spielen die Subtypen 2 und 5 in ca. 70 % der GEP-NEN eine zentrale Rolle. Somatostatin-Rezeptor-2- und -5-positive NEN werden mit radioaktiv markierten Somatostatin-Analoga lokalisiert.

Bei Somatostatin-Rezeptor-positiven NEN ist auch die Radionuklidtherapie eine Option. Bei einer unzureichenden anatomischen Informationslage können die hochspezifischen Liganden in Kombination mit dem CT verwendet werden. Neben der Möglichkeit der Ganzkörperdiagnostik ist die Detektion kleiner Tumoren ein Grund für die Überlegenheit dieser Technik.

Die mediane Sensitivität dieser Untersuchungsmethode liegt bei 84 %. Die Somatostatin-Rezeptor-Szintigrafie spielt als primäres Verfahren für die bildgebende NEN-Diagnostik von hindgut Tumoren nur eine untergeordnete Rolle, da diese Entitäten häufig Rezeptor-negativ sind [Arnold 2005, Faiss et al. 1997].

- **DOTATOC-Positronenemissionstomografie (PET)/CT**

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Sensitivität ist der Nachweis von markierten Somatostatin-Analoga (z. B. 68Ga-DOTATOC) in der PET. Diese Technik wird zur Initialdiagnostik, zum Staging und zur Verlaufskontrolle eingesetzt. Im Vergleich zur konventionellen Somatostatin-Rezeptor-Szintigrafie und zum

diagnostischen CT ist die Detektionsrate deutlich höher. Ein diagnostischer Vorteil besteht vor allem bei kleineren Läsionen oder Knochenmetastasen im Zusammenspiel mit dem CT [Wiedenmann et al. 1998]. Tabelle 6 fasst die Möglichkeiten der Diagnostik zusammen.

**Tab. 6: Diagnostik gastro-entero-pankreatischer neuroendokriner Tumoren (GEP-NEN)**

	<b>Marker</b>	<b>Stimulationstest</b>	<b>Bildgebung</b>
Karzinoid des Vorderdarms	CgA, 5-HIES	-	Endoskopischer US, SRS, Rö-Thorax, CT, Gastroskopie
Karzinoid des Mitteldarms	CgA, 5-HIES	Pentagastrin	SRS, CT, MRT, US
Karzinoid des Hinterdarms	CgA, HCGa/b, PP	-	SRS, CT, MRT, US, Koloskopie
Zollinger-Elison-Syndrom	CgA, Gastrin	Gastrin, BAO/MAO	SRS, CT, MRT, US, endoskopischer US
Insulinom	Glukosespiegel, Insulin, Proinsulin, CgA	48–72 h Fasten-Test	endoskopischer US, US, CT, MRT, (SRS)
Verner-Morrison-Syndrom	Elektrolyte, VIP	-	CT, MRT, US, endoskopischer US, SRS
Glukagonom	Glukagon, CgA	-	CT, MRT, US, endoskopischer US, SRS
Non-funktionell	CgA, PP, HCGa/b		Endoskopischer US, CT, MRT, US, SRS

5-HIES: 5-Hydroxy-Indolessigsäure, BAO/MAO: basale/maximale Säure-Sekretionsrate, CgA: Chromogranin A, CT: Computertomografie, HCG a/b: human chorionic gonadotropin, MRT: Magnetresonanztomografie, PP: pankreatisches Polypeptid, SRS: Somatostatin-Rezeptor-Szintigrafie, US: Ultraschall, VIP: vasoactive intestinal peptide.

Modifiziert nach [Klöppel & Anlauf 2005]

## • **Metastasierung**

Die häufigsten Lokalisationen von GEP-NEN-Metastasen sind die LN, die Leber, die Lunge und das Peritoneum [Wiedenmann et al. 1998]. Aufgrund des Fehlens früher klinischer Symptome werden NEN des Kolons häufig erst in einem ausgedehnt metastasierten Stadium erkannt. Die Metastasen finden sich dann vor allem in der Leber, in den LN, im Mesenterium und/oder dem Peritoneum [Faiss et al. 1997]. Kleine rektale NEN metastasieren selten, größere Tumoren metastasieren in Knochen, LN und Leber. Eine Fernmetastasierung bei rektalen NEN tritt lediglich in 2,3 % der Fälle auf [Chong & Speicher 2001, Faiss et al. 1997].

- **Karzinoid-Syndrom**

Das Karzinoid-Syndrom wird durch die drei klinischen Pfeiler Flush, Diarrhoe und Bauchschmerzen gekennzeichnet. In vielen Fällen liegt ein metastasierter Tumor mit einem Primarius im distalen Jejunum, Ileum, Ileozökalbereich oder Bronchialsystem vor. Das Syndrom entsteht durch die Freisetzung biogener Amine (z. B. Serotonin) oder Neuropeptide (z. B. Tachykinin, Bradykinin) [Klöppel et al. 2004].

Für die biochemische Diagnostik ist der Serotonin-Metabolit 5-HIES von Bedeutung, da er Rückschlüsse auf die Serotonin-Produktion zulässt. Serotonin ist für die Entwicklung der Karzinoid-Herzerkrankung verantwortlich, die durch eine Endokardfibrose des rechten Herzens und nachfolgende Rechtsherzinsuffizienz gekennzeichnet ist.

Die Dauer der Serotonin-Belastung, die genetische Disposition und sekretierte Metabolite wirken bei der Entwicklung einer Karzinoid-Herzerkrankung additiv. Die Therapie des Karzinoid-Syndroms und der Karzinoid-Herzerkrankung zielt primär auf die Reduktion der Tumorlast (Tumor-Debulking) durch Resektion des Primärtumors ab. Bei fortgeschrittener Karzinoid-Herzerkrankung ist ein frühzeitiger Ersatz der Trikuspidalklappe anzustreben. Die konservative Therapie wird entscheidend durch Somatostatin-Analoga und Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) gepr<sup>TM</sup>gt [Litvinov et al. 1994a, Pauli et al. 2003].

- **Therapie der GEP-NEN**

Die klinische Heterogenität der NEN erfordert häufig ein interdisziplinäres Therapiekonzept. Die Behandlung der GEP-NEN-Patienten kann verschiedene Ziele verfolgen. Dazu zählen die komplette Entfernung des Tumors, die Kontrolle der exzessiven Hormonsekretion oder die Begrenzung des lokalen Tumorwachstums. Im metastasierten, palliativen Krankheitsstadium werden zusätzlich lokale Verfahren zur Reduktion der Tumorlast oder eine Embolisationen eingesetzt. Mögliche systemische Therapieformen (s. Tab. 7) sind in Abhängigkeit der Primärtumor-Lokalisation sowie der Prognose und Belastung des Patienten Chemotherapie, Biotherapie, Radionuklid-Therapie oder molekulare Therapien [Litvinov et al. 1997].

**Tab. 7: Therapiemöglichkeiten bei Patienten mit neuroendokrinen Tumoren**

Chirurgie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entfernung des Primärtumors</li> <li>• <i>Tumordebulking</i></li> <li>• Lebertransplantation</li> </ul>
Ablative Verfahren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chemoembolisation</li> <li>• Radiofrequenzablation</li> <li>• Alkoholablation</li> <li>• Radiochirurgie</li> <li>• Selektive interne Radiotherapie (SIRT)</li> </ul>
Rezeptor gerichtete Radiopeptidtherapie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 111 Indium</li> <li>• 90 Yttrium</li> <li>• 177 Lutetium</li> </ul>
Chemotherapie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Streptozotocin (STX)</li> <li>• Doxorubicin</li> <li>• Cisplatin</li> <li>• Octreotid</li> <li>• Interferon alpha (IFN-<math>\alpha</math>)</li> <li>• Etoposid</li> <li>• Dacarbazin</li> <li>• andere</li> </ul>
Biotherapie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Somatostatin-Analoga (z. B. Octreotid)</li> <li>• Interferon alpha (IFN-<math>\alpha</math>)</li> </ul>
Medikamententherapie	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protonenpumpen-Inhibitoren bei Zollinger-Ellison</li> </ul>

Quelle: modifiziert nach [Kuhn et al. 2007]

NEN zeichnen sich durch eine hohe interindividuelle Variabilität aus. Die Therapie richtet sich nach der Wachstumsgeschwindigkeit und den Symptomen. Sie fußt auf vier Säulen [Le Naour et al. 2006, Maetzel et al. 2009]:

- **operative Verfahren:** Resektion solitärer Tumoren und Metastasen als kurative Behandlungsmöglichkeit bzw. Tumor-Debulking in palliativer Absicht zur Tumormassenreduktion
- **medikamentöse Therapie:**
  - a) **symptomatische Therapie** bei nicht resektablen Tumoren oder zur Kontrolle tumorassoziierter Symptome (Somatostatin-Analoga, IFN- $\alpha$ )
  - b) **antiproliferative Therapie** zur Kontrolle des Tumorwachstums (Chemotherapie)
- Strahlentherapie und Radioligandentherapie
- lokoregionale Intervention
  
- **Operative Therapie**

Der erste Schritt in der Behandlungskette der GEP-NEN ist die radikale chirurgische Entfernung des Primärtumors, der Metastasen und aller metastatisch befallener LN.

Diese Therapie ist der einzige kurative Ansatz. Bei Diagnosestellung liegen in den meisten Fällen jedoch bereits Metastasen in Leber, Gehirn oder Knochen vor, sodass eine vollständige Entfernung des Tumormaterials unmöglich ist [Cirulli et al. 1998, Munz et al. 2004, 2009].

Die Indikation zur Resektion wird u.a. durch die Tumorgröße, -art und -lokalisation, dem Grading, der möglichen Metastasierung und der Klinik (funktionelle Aktivität) bestimmt. Die NEN-Chirurgie folgt onkologischen Resektionsprinzipien, wobei ein lokal radikales Vorgehen bei gleichzeitigem Funktionserhalt angestrebt und die chirurgische Strategie individuell nach o. a. Kriterien an die jeweilige Situation angepasst werden muss [Anlauf et al. 2006, 2009, Begum et al. 2014, Raffel et al. 2007, Tonelli et al. 2006]. In Einzelfällen kann jedoch eine Debulking-Operation zur Tumormassenreduktion (> 90 %) indiziert sein [Fendrich et al. 2006, Hellmann et al. 2002, Partensky et al. 1990]. NEN-Patienten zeigten nach einer R0-Operation ein signifikant besseres Überleben als nach einer R1- oder R2-Resektion. Operationen mit palliativer Intention oder ein Verzicht auf eine chirurgische Intervention führte zu eindeutig noch schlechteren Ergebnissen [Pape et al. 2008]

Die Chirurgie der neuroendokrinen Lebermetastasen erfordert eine hohe Expertise und reicht von atypischen laparoskopischen oder offenen über erweiterte Resektionen bis hin zur Lebertransplantation. Zudem besteht die Möglichkeit eines mehrzeitigen Vorgehens mittels portalvenöser Embolisation (PVE), einer „*In-situ Liver Transection* (IsLT)“ oder einer multiplen nicht-anatomischen Leberresektion im Sinne der Gewebe-sparenden Vorgehensweise des „*Cherry picking*“ [Knoefel et al. 2013, Krausch et al. 2014].

Weiter können Operationen palliativ zur Verbesserung der Lebensqualität bei Patienten mit metastasierten Tumoren, intestinalen Obstruktionen sowie bei ausgedehnten Mittel- und Hinterdarntumoren eingesetzt werden [Faiss et al. 1997].

- **Medikamentöse Therapie**

- **Somatostatin-Analoga**

Zur Therapie der funktionellen GEP-NEN werden Somatostatin-Analoga (z. B. Octreotid, Lanreotid) zur Linderung hormonell bedingter Symptome eingesetzt.

Somatostatin-Analoga gleichen in ihrem chemischen Aufbau dem körpereigenen Somatostatin. Ihr Wirkmechanismus beruht auf der Bindung an den Somatostatin-Rezeptor Subtyp 2, wodurch die durch Somatostatin ausgelöste Synthese von Hormonen und Neurotransmittern inhibiert [Aparicio et al. 2001, Arnold et al. 1996, Kölby et al. 2003, Kvols et al. 1987, Öberg 1996] und die spezifischen Symptome funktioneller Tumoren reduziert werden. Bei Insulinomen und Gastrinomen hat sich die Therapie mit Somatostatin-Analoga jedoch als nahezu wirkungslos erwiesen.

Die Dosierung beträgt täglich 2 x 0,05 mg bis 3 x 0,5 subkutan. Dabei tritt in 50–96 % der Fälle eine Abnahme der Flush- und Diarrhoehäufigkeit auf. Einige Studien beschreiben auch einen Effekt auf das Tumorwachstum [Arnold et al. 2000]. In Einzelfällen kommt es unter einer Somatostatin-Analoga-Hochdosis-Therapie (Lanreotid 3 x 5 mg/d) zur Regression des Tumorwachstums [Faiss et al. 1999].

Die asymptomatische Cholezystolithiasis ist mit ca. 10 % die häufige Nebenwirkung der Somatostatin-Analoga-Therapie. Pankreas-Insuffizienzen und abdominale Schmerzen treten nur passager auf. In seltenen Fällen muss eine exokrine Pankreas-Insuffizienz mit Pankreas-Enzymen behandelt werden.

### **Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ )**

IFN- $\alpha$  spielt bei der körpereigenen Abwehr von Tumorzellen eine wichtige Rolle. Damit unterstützt eine IFN- $\alpha$ -Therapie das Immunsystem und senkt die unkontrollierte Hormonproduktion der Tumorzellen. Die IFN- $\alpha$ -Wirkung beruht auf der direkten Inhibition der Zellproliferation und der Stimulation von Natürlichen Killerzellen sowie Makrophagen. Darüber hinaus hemmt IFN- $\alpha$  die Angiogenese. Die daraus folgende Abnahme der Tumorsekretionsprodukte ist der Grund für die Besserung der symptomatischen Beschwerden [Schürmann et al. 1992]. Die IFN- $\alpha$ -Therapie zeigt bei metastasierten GEP-NEN einen anti-proliferativen Effekt.

Ein biochemisches Ansprechen besteht in 40–50 % der Fälle. Bei 40–70 % der Patienten kommt es zu einer Besserung der Symptome und bei 10–15 % zu einer signifikanten Tumorverkleinerung.

Laut Studien liegt die mittlere Überlebensrate bei Therapiebeginn bei mehr als drei Jahren. NEN des Dün- und Dickdarms reagieren sensibler als pankreatische Tumoren auf die Behandlung. IFN- $\alpha$  (3–5 MU/m<sup>2</sup>) ist drei bis fünfmal pro Woche über

mehrere Wochen zu verabreichen. IFN- $\alpha$  kann in Kombination mit Somatostatin-Analoga oder als Monosubstanz gegeben werden. Laut Standardprotokoll werden zur Therapie hormonell bedingter Symptome zuerst Somatostatin-Analoga und bei Unverträglichkeit oder nachlassender Wirksamkeit IFN- $\alpha$  verabreicht [Frank et al. 1999]. Die Kombination mit Somatostatin-Analoga steigert das Ansprechen der Tumorzellen.

Laut klinischer Studien weisen Patienten mit einer Resistenz gegen Somatostatin-Analoga in Kombination mit IFN- $\alpha$  eine biochemische Ansprechrate von 77 % auf. Bei 18 % der Patienten normalisierten sich die Laborwerte. Die fehlende Tumorverkleinerung beruht möglicherweise auf der Induktion einer Tumorfibrose durch IFN- $\alpha$ . Somatostatin-Analoga steigern die Verträglichkeit von IFN- $\alpha$  [Faiss et al. 2003, Vberg et al. 1994]. Beobachtete Nebenwirkungen sind Fieber und grippeähnliche Symptome.

Ein weiterer Ansatz ist die Therapie mit dem mammalian target of rapamycin (mTOR) Inhibitor Everolimus oder dem Multikinase-Inhibitor Sunitinib. Unter Everolimus kam es zu einer Verlängerung des progressionsfreien Überlebens um 6,4 Monate und unter Sunitinib um 5,9 Monate [Raymond et al. 2011, Yao et al. 2011]

In der RADIANT-2 Studie führte die Kombination von Everolimus mit einem Somatostatin-Analoga zu einer Verbesserung des progressionsfreien Überlebens bei Patienten mit fortgeschrittenem NEN und gleichzeitig bestehendem Karzinoid-Syndrom, unabhängig von einer vorangegangenen Somatostatin-Analoga-Therapie [Robiolo et al. 1995]. In der Folgestudie RADIANT-3 verlängerte sich das progressionsfreie Überleben signifikant von 4,6 auf 11 Monate bei Patienten mit fortgeschrittenen pankreatischen NET. Das Progressionsrisiko reduzierte sich um 65 % im Vergleich zum Placebo-Arm [Lombard-Bohas et al. 2015]

## **Chemoembolisation**

Lebermetastasen weisen keinen Anschluss an die Pfortaderäste auf. Durch eine selektive Mikroembolisation – mit oder ohne Zugabe von Chemotherapeutika – der

Äste der Arteria hepatica wird daher die Blutversorgung intrahepatischer Metastasen unterbrochen.

## **Chemotherapie**

Die Effizienz der Chemotherapie wird durch die Lokalisation und Differenzierung des NEN entscheidend beeinflusst. Karzinoide des Mitteldarms und Pankreas-NEN zeigen unterschiedliche biologische Reaktionen:

### **Gut differenzierte NEC des Mitteldarms**

Die Behandlung der NEN des Mitteldarms umfasst chirurgische Maßnahmen, Chemoembolisationen, IFN- $\alpha$ , Somatostatin-Analoga und Chemotherapie. Bei gut differenzierten, metastasierten NEN des Mitteldarms sollte zunächst eine weniger aggressive Therapie mit z. B. Somatostatin-Analoga oder IFN- $\alpha$  zum Einsatz kommen. Bei einem fortgeschrittenen Tumorleiden oder aber auch bei einem hohen Proliferationsindex (G3) steigt der Stellenwert der Chemotherapie [Öberg et al. 1994].

Monochemotherapien mit Streptozotocin (STX), Doxorubicin, 5-Fluorouracil (5-FU), Dacarbacin, Aktinomycin und Cisplatin zeigen Ansprechraten von 0–26 % [Moertel 1987]. Kombinationschemotherapien sind kaum effektiver. Bei Therapien mit STX + 5-FU oder STX + Doxorubicin liegen die Ansprechraten bei 0–30 % [Gregorc et al. 2007]. Das Ansprechen der NEN des Mitteldarms korreliert jedoch positiv mit dem Proliferationsindex [Wiedenmann et al. 1998], sodass Patienten mit schnell wachsenden Tumoren eher profitieren.

### **Gut differenzierte NEC des Vorderdarms**

Diese zumeist im Pankreas und Duodenum liegenden Tumoren reagieren in der Regel empfindlicher auf eine Chemotherapie als Karzinome des Mittel- oder Hinterdarms. Klinische Studien zur STX-Monotherapie belegen für gut differenzierte, metastasierte Pankreas-NET Ansprechraten von 30–40%. Auf Kombinationstherapien mit STX + 5-FU bzw. + Doxorubicin reagieren 63 bzw. 69 % der Tumoren. Dieser Effekt dauert bei einigen Patienten zwei Jahre an. Die mittlere Überlebenszeit beträgt 2,2 Jahre [Öberg 1996, Öberg et al. 1994].

Die Kombination von STX + 5-FU / Doxorubicin führt bei 40–60% der Patienten zu einer partiellen Remission [Öberg et al. 1994]. Daher sollten Patienten mit progressiven, nicht-operablen NEC des Vorderdarms mit Chemotherapeutika und Somatostatin-Analoga behandelt werden [Wiedenmann et al. 1998].

### **Anaplastische Tumoren**

Nur ca. 7 % der Fälle mit gut differenzierten NEN reagieren auf eine Kombination von Etoposid + Cisplatin. Dagegen betragen die Ansprechraten bei anaplastische NEN 67 % mit einer Dauer von durchschnittlich 18 Monaten [Schürmann et al. 1992].

Insgesamt sind Chemotherapien bei fortgeschrittenen Tumorleiden oder bei einem hohen Proliferationsindex (G3) u. a. bei malignen Pankreas- und Vorderdarm-NEN sinnvoll. Die Wahl der Kombinationstherapie (STX, 5-FU + Doxorubicin oder Cisplatin + Etoposid) hängt von den Eigenschaften des Tumors ab [Öberg 1996].

- **Zielsetzung der Studie**

Das Zell-Adhäsionsmolekül EpCAM (CD326) wird in unterschiedlichen Tumoren überexprimiert. Laut verschiedener Studien korreliert das Ausmaß der Überexpression mit der Prognose, wobei hohe EpCAM-Werte potenziell mit einem malignen Verlauf assoziiert sind. Damit eignet sich EpCAM möglicherweise auch als potenzieller Prognosemarker bei NEN. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der Eignung von EpCAM als Prognosemarker im Vergleich zu dem Standard-Proliferationsmarker Ki-67 bei Gastrinomen, Pankreas-Karzinomen und anderen GEP-NEN.

- **Material und Methoden**

- **Geräte, Materialien, Software**

Die folgende Aufstellung listet alle in der Dissertation verwendeten Materialien und Geräte sowie die Software auf:

- 10 × Target Retrieval Solution (S1699, DAKO, Hamburg)
- ABC-Kit (Vectastain, Peroxidase:
- Mouse-Immunglobulin (Ig) G:PK-4002, Rabbit-IgG:PK-4001)
- AB-Serum (Biotest, 805135, Bio-Rad)
- Kryoschneider (SLEEMainz, MHR-Controller, 22778)
- Diaminobenzidin (DAB) + Chromogen (DAKO, K3468)
- DAKO Fettstift (DAKO, Hamburg)
- Deckgläschen (Menzel-Glaser)
- E-Cadherin-Antikörper (DAKO, M3612, NCH-38)
- Entellan (MERCK, 38, Darmstadt)
- EpCAM-Antikörper (DAKO, M0804, Ber-EP4)
- Ethanol 70 %ig, 90 %ig, 100 %ig (Roth, Karlsruhe)
- Gefrierschrank (Thermo electron corporation, Forma 905)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, 8597.1000 304K19013597)
- Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Lösung (Sigma, Deisenhofen)
- Mikroskop (Leica, DMIL, 49775)
- Mikrotom (Leica, SM2000R, 50749)
- Mouse-IgG1 (MOPC-21) (Sigma, M5284)
- Objektträger (Engelbrecht)
- Phosphat-buffered-saline (PBS) (Gibco, 14190-169, pH 7,4)
- *Peroxidase Mouse IgG* (Vector laboratories, PK4001 10-20/21)
- Pipettenspitzen (Eppendorf VWR)
- Plastikpipetten (International 631-0801)
- Rabbit IgG-Fraction (DAKO, X0903)
- SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA)
- Ki-67-Antikörper
- Stanzgerät (Beecher Instruments)
- Wärmeschrank (Memmert, 38146)

- Wasserbad (Färbung) (Mommert, 52636)
- Wasserbad (Leica, HI 1210, 50750)
- Xylol (Merck, 1.08685.2500)

- **Patienten**

Im Rahmen der Arbeit wurden 85 NEN-Patienten (38 Frauen und 47 Männer), die in der Chirurgischen Klinik A (Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Kinderchirurgie) im Zeitraum von 1992 bis Juli 2008 behandelt wurden und von denen ausreichend Gewebe (Paraffinblöcke) verfügbar war, untersucht. 14 Patienten hatten ein Gastrinom, 35 Patienten ein Pankreas-NEN und 36 Patienten eine andere GEP-NEN (s. Tab. 16 im Anhang). Die Daten der Tumorpatienten wurden retrospektiv erhoben. Die Proben für die immunhistochemischen Analysen wurden im Rahmen der Operation der Patienten gewonnen. Die Tumorproben wurden nach der Resektion in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die histopathologische Sicherung einer NEN erfolgte durch den Nachweis von CgA und Synaptophysin in jeder Probe. Anschließend wurden die Tumorpräparate mit Hilfe der Tissue-Microarray-(TMA)-Technik immunhistochemisch analysiert. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Düsseldorf lag vor (Studennummer des Ethikvotums: 3821).

Die anonymisierten Patientendaten, die als Grundlage für die statistische Auswertung erfasst wurden, befinden sich in der Tabelle 16 im Anhang.

- **Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)**

EpCAM ist ein Zell-Adhäsionsmolekül, das auf der Zelloberfläche von Epithelzellen unter anderem Zell-Zell-Kontakte vermittelt. Durch differentielle Glykosylierung variiert seine molekulare Masse von 37 bis 42 kDa [Tomoda et al. 1989, Westberg et al. 2001]. Die durch EpCAM vermittelten Zell-Zell-Adhäsionen sind im Vergleich zu durch andere Adhäsionsmoleküle ausgelöste Kontakte weniger stark ausgeprägt [Litvinov et al. 1994a, 1997]. Zu den Hauptaufgaben bzw. -effekten von EpCAM gehören neben der Zelladhäsion, die Wechselwirkung mit anderen Membranproteinen, die Induktion der Zellproliferation und die Expression Karzinom-assoziiertes Proteine [Kuhn et al. 2007, Le Naour et al. 2006, Maetzel et al. 2009, Munz et al. 2004, 2009]. EpCAM wird in allen adulten Epithelgeweben gebildet [Cirulli et al. 1995, 1998]. 1979 wurde

EpCAM als Kolorektalkarzinom-spezifisches Antigen identifiziert [Herlyn et al. 1979]. Laut Studien produzieren die meisten Karzinome EpCAM [Went et al. 2004]. Durch die EpCAM-Expression an der Zelloberfläche von Tumorzellen erschließen sich neue Therapiewege. EpCAM kann z. B. als Zielmolekül für Antikörper oder rekombinante Derivate von Antikörpern verwendet werden [Armstrong & Eck 2003, Baeuerle & Gires 2007, Braun et al. 1999]. Die Interaktion von EpCAM-Molekülen auf verschiedenen Zellen [Litvinov et al. 1994a, 1994b] führt zu Wechselwirkungen ihrer zytoplasmatischen Domänen mit Aktinin und dem Aktin-Zytoskelett. Eine Strategie bei der Behandlung von EpCAM-positiven Tumoren ist die Zerstörung der EpCAM-unterstützten Adhäsionen durch das Aktin-Depolymerisationsagens Zytochalsin D [Arnold et al. 2000]. Eine EpCAM-Überexpression verstärkt die Adhäsion. Hierbei gehen die Zellen über Cadherine intrazelluläre Wechselwirkungen ein, die als Ergebnis die Reduktion der Cadherin-vermittelten Adhäsionen zur Folge haben [Litvinov et al. 1997]. Bei einer unveränderten Anzahl der Cadherin-Moleküle wird die Assoziation der Cadherin-Catenin-Komplexe mit dem Zytoskelett unterbunden. Zwar reduziert sich die  $\alpha$ -Catenin Proteinmenge, die  $\beta$ -Catenin Proteinmenge bleibt jedoch konstant. Bei einer EpCAM-Überexpression wechselt  $\beta$ -Catenin in Zelllysaten jedoch von der unlöslichen in die lösliche Form. Dieser Effekt auf die Cadherin-gestützte Adhäsion wird bei zytoplasmatischen Deletionsmutanten von EpCAM nicht beobachtet. Das Bindeglied zwischen EpCAM und der Cadherin-gestützten Adhäsion ist Alpha-Aktinin, das an den zytoplasmatischen Teil von EpCAM bindet [Litvinov et al. 1997]. Der Signalweg zur Steuerung von Cadherin beinhaltet die Phosphoinositol-3-Phosphat Kinase (PI3K) und Inhibitoren von PI3K. Die EpCAM-Expression induziert das Zellwachstum durch die Induktion Proliferations- und Metabolismus-assoziiierter Gene. Bei einer ektopischen Expression von EpCAM kommt es zu einer verstärkten Expression von c-Myc und Cyclin A/E [Munz et al. 2004].

Die Signaltransduktion von EpCAM wird über eine Intramembranproteolyse (RIP) reguliert [Mumm & Kopan 2000]. Nach der Abspaltung der extrazellulären Domäne (EpEX) durch das Enzym Tumornekrosefaktor-alpha-konvertierendes Enzym (TACE) erfolgt die intramembranäre Proteolyse von EpCAM durch den Presenilin-Typ- $\gamma$ -Sekretase-(PS)-Komplex, wodurch auch die intrazelluläre, signaltransduzierende Domäne (EpICD) von der Membran freigesetzt wird. Bei EpEX handelt es sich um einen löslichen Liganden von membranständigen EpCAM-Molekülen. Die Spaltung

von EpCAM wird durch spezifische Inhibitoren des Presenilin-Typ- $\gamma$ -Sekretase-(PS)-Komplex und des Tumornekrosefaktor-alpha-konvertierenden Enzyms verhindert. Eine Inhibition der Spaltung verlangsamt das Zellwachstum [Maetzel et al. 2009]. Als direkter intrazellulärer Interaktionspartner von EpCAM wurde das Protein four and a half LIM domain (FHL2) ermittelt. Die Bindung an EpiCD erfolgt über die vierte LIM-Domäne von FHL2, die zweite und dritte LIM-Domäne binden an  $\beta$ -Catenin und an den Lymphoid enhancer-binding factor 1 (Lef-1) [Labalette et al. 2004, Martin et al. 2002]. Die Transkription des c-myc Gens wird durch Translokation des EpiCD/FHL2/ $\beta$ -Catenin/Lef1-Kernkomplex in den Zellkern gesteuert [Takes et al. 2001, Winter et al. 2003a].

Laut Studien steht die benigne oder maligne Proliferation in epithelialen Geweben mit einer vermehrten Expression von EpCAM in Zusammenhang [Went et al. 2005, Zorzos et al. 1995]. Das Ausmaß der EpCAM-Expression nimmt mit dem Grad der Neoplasie zu [Went et al. 2005]. Eine erhöhte EpCAM-Expression tritt auch bei Dünndarm-, Kolon-, Lungen-, Prostata- und Brustkrebs auf [Clarke et al. 1997, Endl & Gerdes 2000, Fong et al. 2006, Gerdes et al. 1984a, 1984b, Michalides et al. 2002, Ohike & Morohoshi 2005, Pelosi et al. 1996, Perret et al. 1998, Scholzen & Gerdes 2000, Schwarting 1993, Starborg et al. 1996, Stoecklein et al. 2006, Takes et al. 2001, Varga et al. 2004, Went et al. 2004, 2005, 2006, Winter et al. 2003a, 2003b, Yamashita et al. 2007, Zimmermann & Bosman 2003]. Neuronale Tumoren, Melanome, Sarkome und Lymphome zeigen dagegen keine EpCAM-Expression. In EpCAM-exprimierenden Tumoren kann das Protein als prognostischer und therapeutischer Marker eingesetzt werden [Armstrong & Eck 2003, Baeuerle & Gires 2007, Went et al. 2004, 2006]. Eine EpCAM-Überexpression steht bei Karzinomen des Ösophagus, Pankreas, Kolons und der Brust mit einer schlechten Überlebensprognose in Zusammenhang [Fong et al. 2006, Stoecklein et al. 2006, Varga et al. 2004, Went et al. 2004, 2006]. Metastasen zeigen jedoch eine verminderte EpCAM-Expression [Takes et al. 2001, Varga et al. 2004].

- **Ki-67**

In der Histochemie wird das Ki-67-Antigen als Proliferationsmarker verwendet, da es ausschließlich von sich teilenden Zellen exprimiert wird. In Studien wurden zwei Isoformen von 345 und 395 kDa identifiziert [Gerdes et al. 1984b]. Ki-67 wird nur in

den aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2 und M-Phase), nicht jedoch nicht in der G0-Phase (ruhende Zelle) exprimiert [Gerdes et al. 1984b]. Beim Übergang der Zelle in einen nicht-proliferativen Zustand wird Ki-67 abgebaut [Scholzen & Gerdes 2000]. Damit lässt sich aus der Ki-67-Anfärbbarkeit eines Tumors auf seine Wachstumsgeschwindigkeit schließen. Hohe Farbintensitäten sprechen für eine hohe biologische Aktivität des Tumors [Clarke et al. 1997, Ohike & Morohoshi 2005, Perret et al. 1998, Pelosi et al. 1996, Zimmermann & Bosman 2003].

Zellen, die nach der Mitose weiter proliferieren, beschreiten einen im Vergleich zu Zellen der G1-Phase anderen metabolischen Weg. Die G1-Phase wird in eine G1A- und G1B-Phase eingeteilt. Die Phasen G1T, G1a und G1b werden als Startsequenzen gewertet. Die Phasen G1A und G1B werden zum Ruhezustand des Zellzyklus gezählt [Gerdes et al. 1984b]. Die Phasen G0, G1T, G1a und G1b sind Ki-67-negativ. Eine Expression von Ki-67 findet in den Phasen G1A und G1B statt [Gerdes et al. 1984b].

Weiterhin verändert sich die Lokalisation von Ki-67 innerhalb der Zelle während des Zellzyklus. In der Interphase befindet sich Ki-67 in den Nukleoli [Litvinov et al. 1994b]. In der Prophase wandert Ki-67 zur Oberfläche der kondensierten Chromosomen [Gerdes et al. 1984b, Starborg et al. 1996]. Wenn in der Telophase neue Nukleoli entstehen, wandert Ki-67 wieder zurück. Es wird vermutet, dass die Regulation des Ki-67 über posttranslationale mitosespezifische Modifikationen gesteuert wird [Endl & Gerdes 2000].

Trotz der Bedeutung des Ki-67-Nachweis für die Diagnostik (prognostischer Marker) und Forschung (Zellproliferationsmarker) [Gerdes et al. 1984a, Schwarting 1993] bietet Ki-67 keine Möglichkeit für therapeutische Interventionen [Michalides et al. 2002].

- **Tissue-Microarrays (TMA)**

Die TMA-Technik wird in klinischen Studien zur Tumoranalyse eingesetzt. Das Besondere an dieser Methode ist, dass auf einem Objektträger eine große Anzahl von Tumorproben gleichzeitig in einem Durchgang und unter standardisierten Bedingungen untersucht werden können. Etablierte in-situ-Methoden (z. B. Immunhistochemie, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)) sind häufig langwieriger, arbeitsaufwändiger und teurer. Mit der TMA-Methode können Ribonukleinsäure/Desoxyribonukleinsäure-(RNA/DNA)- oder Proteinprofile in zahlreichen Gewebeproben gleichzeitig bearbeitet werden [Marshall & Bodnarchuk 1993].

Diese Methode erlaubt die Untersuchung eines großen Patientenkollektivs in kurzer Zeit, was die Übertragung der molekularen Befunde auf klinische Sachverhalte erleichtert [Bubendorf et al. 2001, Moch et al. 2001]. Die Hauptvorteile der Technik sind die Verkürzung der Analysezeiten und die vereinfachte Interpretation der Daten. Aufgrund der besseren Vergleichbarkeit der Daten, trägt die Methode zudem zur Qualitätssicherung bei [Kallioniemi et al. 2001, Milanes-Yearsley et al. 2002, Nocito et al. 2001a, 2001b].

Die Herstellung eines TMA-Blocks beginnt mit der Fixierung des Gewebes in einem Paraffinblock. Mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms werden 5 µm dicke Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgezogen und mit HE gefärbt. In dem erstellten HE-Schnitt wird der Tumor im Paraffinblock per Folienstift markiert. Für die weitere Herstellung der TMA-Blocks wird ein Stanzgerät verwendet (s. Abb. 1). Zunächst wird ein Loch in einen Empfängerblock (leerer Paraffinblock) und anschließend aus dem Tumorblock/Donorblock ein 6 mm breiter und 3 mm tiefer Gewebezylinder gestanzt und anschließend in das vorgesehene Loch im Empfängerblock eingelassen [Hsu et al. 2002, Mirlacher & Storz 2000].

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Herstellung der TMA-Blocks jeweils eine Probe des Tumors, eine Probe aus Jejunum-Normalgewebe sowie eine Probe aus Leber- und LN-Metastasen verwendet. Dieser Arbeitsschritt wurde in geordneter Reihenfolge für alle Patientenproben wiederholt. Der TMA-Block war folgendermaßen aufgebaut: Proben von zwei Patienten nebeneinander sowie von 10 Patienten untereinander in der linken Hälfte und von 12 Patienten in der rechten Hälfte. Der Abstand zwischen den Proben der Patienten einer Reihe betrug 1,5 mm, der Probenabstand zwischen den Stanzen verschiedener Reihen 3 mm.

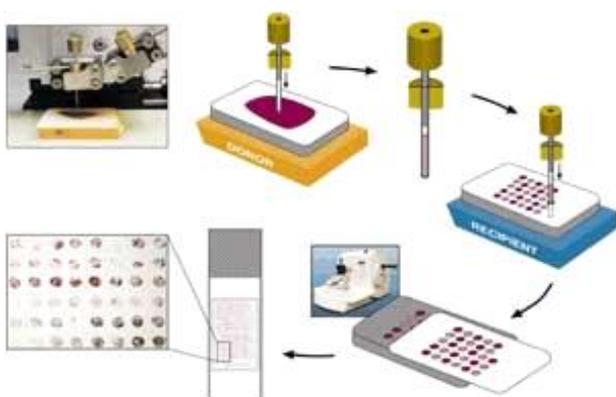
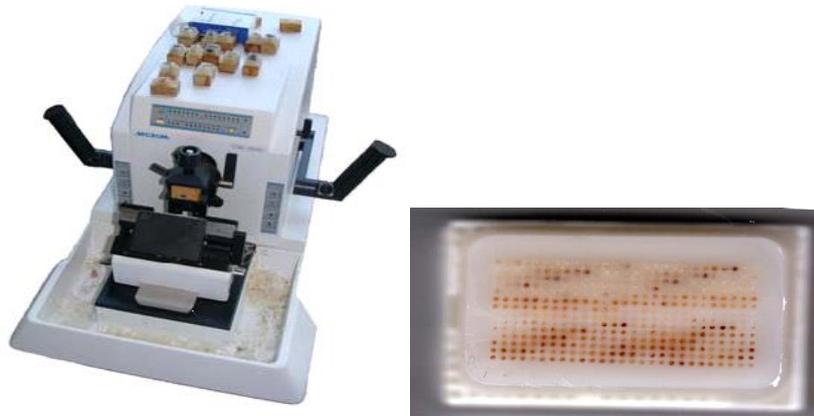


Figure 1

**Abb. 1: Herstellung des Tissue-Microarrays**  
Quelle: [www.alphametrix.de](http://www.alphametrix.de)



**Abb. 2: Tissue-Microarray-Block (links) und Mikrotom rechts**  
Quelle: [www.ddbrite.appsport.com](http://www.ddbrite.appsport.com)

- **Schnittherstellung**

Vor den immunhistochemischen Färbungen wurden mithilfe eines Mikrotoms Schnitte aus dem TMA-Block hergestellt (s. Abb. 2). Dadurch wurde eine konstante Schnittdicke sichergestellt.

Beim Schneidevorgang bewegt sich die Klinge des Schlittenmikrotoms über dem mit Schrauben fixierten Paraffinblock. Um Brüche im Paraffinblock zu vermeiden, sollten die zur Fixation eingesetzten Schrauben nicht zu stramm angezogen werden und der Paraffinblock vor Beginn dem Schneidevorgang eine halbe Stunde bei  $-20\text{ °C}$  gelagert werden.

Am Schlittenmikrotom wurde die Klinge auf eine Schnittdicke von  $5\text{ }\mu\text{m}$  eingestellt. Um eine identische Schnittdicke zu erzielen, wurde nach jedem Schnitt der Block mit Hilfe eines Vorschubmechanismus um die eingestellte Schnittdicke angehoben.

Nach dem Schneiden wurden die Gewebeproben mit einem glatten Papier in ein Warmwasserbad mit destilliertem Wasser (Aqua dest) der Temperatur  $20\text{ °C}$  gelegt. Die daraus resultierende Entfaltung der Schnitte erleichtert die Platzierung auf einem Objektträger. Dazu wurde der Objektträger im Wasserbad unter den Schnitt geführt und ohne Luftblasen herausgehoben. Die Haftung des Schnittes auf dem Objektträger erfolgte durch Adhäsion.

Nach jedem Patienten wurden die Klingen des Schlittenmikrotoms mit einem Pinsel zur Entfernung der Paraffinreste gereinigt. Hierbei wurde der Pinsel in Richtung der

Schnittfläche geführt, um eine Abstumpfung der Klinge zu vermeiden und eine gleichbleibende Schnittqualität zu gewährleisten

Im nächsten Schritt wurden die Gewebeschnitte im Ofen 20 min bei 70 °C und anschließend über Nacht bei 56 °C erhitzt. Dadurch sollte eine Ablösung vom Objektträger beim Färbeprozess verhindert werden.

- **Immunhistochemie**

Die immunhistochemische Färbung von EpCAM und Ki-67 erfolgte anhand von Färbeprotokollen (siehe unten). Der Nachweis von EpCAM erfolgte über die Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode). Ki-67 wurde mit dem Vectastatin Elite mouse-IgG-Kit sowie den primären monoklonale Antikörper Ki-67 des Klons MIB-1 der Firma DAKO nachgewiesen. Für beide Protokolle wurde das Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Tumorgewebe in 5 µm Schnittstärke auf Superfrost-Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht und mit Xylol entparaffinisiert.

- **Immunhistochemie EpCAM**

Zur Entparaffinisierung und Rehydratation durchliefen die Schnitte eine absteigende Alkoholreihe. Dabei wurden die Präparate dreimal für 10 min in Xylol (Merck 1.08685.2500), zweimal für 5 min in 99,5 %iges Ethanol, zweimal für 5 min in 96 %iges Ethanol, zweimal für 5 min in 80 % iges Ethanol sowie einmal für 5 min in 70 %iges Ethanol gestellt. Anschließend wurden die Präparate für mindestens 5 min in Aqua dest gegeben. Im weiteren Verlauf wurden die Schnitte in einem Gemisch aus 10 x Target Retrieval Solution (DAKO S1699) in der Konzentration 1:10 verdünnt mit Aqua dest in einer Glasküvette mit Deckel für 30 min bei 95 °C im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen der Präparate für 20 min in der Flüssigkeit wurden sie erst 5 min in PBS und dann in Aqua dest gewaschen. Zur Inhibition der endogenen Peroxidase wurden die Präparate für 30 min in 0,3 %ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS-Lösung bei Raumtemperatur (RT), inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte 5 min in 1 x PBS gespült und mit dem Liquid Blocker Super Pap Pen Mini (MBT Brand, 297840010) umrandet.

Anschließend wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen für 20 min bei RT mit drei Tropfen Normalserum auf 10 ml 1 x PBS blockiert.

Danach wurde der Primärantikörper in 10 % AB-Serum angesetzt. Hierfür wurde AB-Serum im Verhältnis 1:10 mit Dulbeccos's phosphate buffered saline (DPBS) verdünnt. Die Inkubation der Präparate mit dem Primärantikörper bei RT dauerte 30 min. Danach erfolgte eine zweimalige Waschung für je 3 min in 1 x PBS.

Ein Tropfen des Sekundärantikörpers (biotinylierter Antikörper) wurde mit 10 ml 1 x PBS in einer Küvette gemischt. Die Lösung wurde für 30 min auf die Präparate gegeben. Anschließend wurden die Präparate zweimal für je 3 min in 1 x PBS gewaschen.

Das Vectastin ABC-Reagenz wurde 30 min vor der Benutzung aus 2 Tropfen Reagenz A plus 2 Tropfen B und 10 ml 1 x PBS hergestellt. Die Inkubation der Präparate mit der Lösung dauerte ebenfalls 30 min bei RT. Danach wurden die Präparate erneut 5 min in 1 x PBS gewaschen.

Schließlich werden die Präparate für 10 min mit einer lichtgeschützt aufbewahrten Diaminobenzidin-(DAB)-Substrat-Chromogen-Lösung hergestellt aus 1 ml Buffered Substrate for Liquid DAB (DAKO Corporation) und 1 Tropfen Liquid DAB-Chromogen (DAKO Corporation) bedeckt. Nachfolgend wurden die Schnitte zweimal 5 min in Leitungswasser abgespült.

Die Kernfärbung erfolgte durch ein Eintauchen (15 s) in Hämalaun (Merck, 1.09249.2500). Anschließend wurde das überschüssige Hämalaun unter fließendem Leitungswasser 15 min lang abgespült. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verwendung in Aqua dest aufbewahrt.

Die Proben wurden einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 1 min 70 %iges / 80 %iges und 99 %iges Ethanol) unterzogen. Danach wurden die Präparate mindestens 2 min in Xylol gestellt. Abschließend wurden die Präparate mit Hilfe des Klebers Entellan und einem Deckglas eingeschlossen.

- **Prinzip der Avidin-Biotin-Complex-Methode**

Das Prinzip der ABC-Methode beruht auf der hohen Affinität des Glykoproteins Avidin zu dem wasserlöslichen Vitamin Biotin. Die Komplexe bestehen aus einem Avidin und maximal vier Biotinmolekülen.

Der Nachweis von Proteinen erfolgt über die Markierung mit einem Primärantikörper (spezifischer Antikörper). Anschließend wird ein biotinylierter Sekundärantikörper

hinzugefügt, der an den Primärantikörper bindet. An das Biotin des Sekundärantikörpers bindet wiederum ein Komplex aus biotinylierter Peroxidase und Avidin. Drei Peroxidasmoleküle werden über Biotin an Avidin gebunden. Die vierte Biotinbindungsstelle des Avidin ist vom Biotin des Sekundärantikörpers besetzt. Dadurch erfolgt eine Amplifikation des Signals. Nach Zugabe des Peroxidase-Substrates DAB und  $H_2O_2$  bildet sich ein brauner schwerlöslicher Niederschlag auf dem Schnitt.

Durch die hohe Affinität von Avidin zu Biotin und die fehlenden endogenen Avidin-Bindungsstellen tritt eine unspezifische Färbereaktion kaum auf. Die Menge des Antigens korreliert mit der Farbintensität des Schnitts.

- **Färbeprotokoll**

- Xylol dreimal 10 min
- absteigende Alkoholreihe:
  - 99,5% Ethanol zweimal 5 min
  - 96% Ethanol zweimal 5 min
  - 80% Ethanol zweimal 5 min
  - 70% Ethanol einmal 5 min
- *Aqua dest* 5 min
- Retrieval Solution (1:10 in *Aqua dest*) 30 min bei 95 °C
- Retrieval Solution 20 min bei RT
- Waschen in PBS 5 min
- Blockierung der endogenen Peroxidase mit  $H_2O_2$
- Waschen in PBS dreimal 3 min
- Unterbindung von unspezifischen Anfärbungen durch hydrophobe Bindungen von Immunglobulinen an Membranen oder Fettgewebe
- (3 Tropfen Normalserum aus den Vectastain Elite mouse-IgG-Kit auf 10 ml steriles PBS ) 20 min
- Primärantikörper (in 10 % AB-Serum) 45 min
- Waschen in PBS dreimal 3 min
- Sekundärantikörper (1 Tropfen/10 ml PBS) 30 min
- Waschen in PBS dreimal 3 min
- Inkubation mit ABC-Reagenz 1 Tropfen

- Reagenz A + 1 Tropfen. Reagenz B/5 ml PBS 30 min
- Waschen in PBS dreimal 3 min
- Farbentwicklung mit DAB-Substrat:
  - 10 Tropfen Chromogen/10 ml Substratpuffer 10 min
  - Waschen mit Leitungswasser zweimal 5 min
  - Kerngegenfärbung mit Hämalaun-Lösung
  - nach Mayer 15 s
  - Waschen in fließendem Wasser 20 min
- Aufsteigende Ethanolreihe:
  - 70%iges / 80%iges und 99%iges Ethanol jeweils 1 min
- Xylol 2 min
- Eindeckeln mit Entellan
- 

- **Immunhistochemie Ki-67**

Das Färbeprotokoll für Ki-67 unterscheidet sich in einigen Punkten vom ABC-Protokoll, daher werden nachfolgend die Unterschiede aufgeführt:

Bei der Entparaffinisierung und Dehydrierung erfolgte die Waschung in Xylol für jeweils 15 min in Xylol und bei der aufsteigenden Alkoholreihe gab es zwei Waschschriffe mit 100 %igem Ethanol.

Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte durch ein 20-minütiges Einlegen der Schnitte in 3 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol (= 3 ml 30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 97 ml Methanol). Anschließend wurden die Schnitte jeweils zweimal in 96 %igem und 70 %igem Alkohol und in *Aqua dest* eingelegt.

Die folgende Demaskierung der Schnitte erfolgte durch Erhitzen in Natrium-Citrat-Puffer bei pH 6. Der Citrat-Puffer setzte sich aus 18 ml der Lösung A (21,01 g 0,1-molare Zitronensäure (Merck#244) in 1 l Aqua dest), 82 ml der Lösung B (29,41 g 0,1-molares Natrium-Citrat (Merck #6448) in 1 l Aqua dest) und 900 ml Aqua dest zusammen. Nach dem Kochvorgang der Schnitte (5 min) im Schnellkochtopf wurde der Deckel geöffnet und vorsichtig Leitungswasser zum Puffer gegossen. Anschließend wurden die Schnitte mit Aqua dest und zweimal mit PBS gewaschen.

Die Schnitte wurden für 20 min in ein Blockierungsserum (3 Tropfen Normalserum aus den Vectastain Elite mouse-IgG-Kit auf 10 ml steriles PBS) gelegt, um eine unspezifische Anfärbung durch hydrophobe Bindungen von Immunglobulinen an Membranen oder Fettgewebe zu unterbinden.

Bei der immunhistochemischen Färbung von Ki-67 kam das Detektionssystem Vectastatin Elite mouse-IgG-Kit sowie der primäre monoklonale Antikörper Ki-67 des Klons MIB-1 der Firma DAKO UK zum Einsatz. Das IgG1 bindet spezifisch an das nukleäre Antigen Ki-67. Der Primärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100 in DAKO-Verdünnungsmedium verabreicht. Nach der zweimaligen Waschung mit PBS erfolgte die Zugabe des biotinylierten Anti-mouse Sekundärantikörpers (= 3 Tropfen Normalserum, 1 Tropfen Anti-mouse IgG und 10 ml DAKO-Verdünnungsmedium) für 30 min. Die Proben wurden für 30 min mit dem ABC-Komplex (4 Tropfen Lösung A, 4 Tropfen Lösung B und 10 ml steriles PBS) inkubiert und anschließend erneut mit PBS gewaschen. Für die Färbung mit DAB wurden 2 Tropfen Pufferkonzentrat mit 2 Tropfen DAB-Chromogen und 2 ml Aqua dest vermischt. Diese Lösung wurde für 8–10 min auf die Objektträger/Schnitte gegeben. Danach wurden die Proben mit Aqua dest gewaschen, 2 min mit saurem Hämalaun nach Mayer gegengefärbt und 5 min in Leitungswasser gebläut. Zuletzt wurden die Schnitte in eine bis Xylol aufsteigende Alkoholreihe getaucht und mit Entellan eingedeckelt.

- **Auswertung der EpCAM- und Ki-67-Expression**

Die Expression von EpCAM und Ki-67 wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Remmele-Score (auch Immunreaktiver Score, IRS) quantifiziert. Bei dieser Auswertungsmethode wird eine Skala von 0 bis 12 verwendet. Der IRS wird aus dem Produkt des Proportions-Score und Intensitäts-Score der angefärbten Tumorzellen gebildet (s. Tab. 8). Hierbei beschreibt der Proportions-Score den Anteil der positiv-gefärbten Tumorzellen (0 = keine Färbung, 1 = 1–10 % angefärbt, 2 = 11–50 % angefärbt, 3 = 51–80 % angefärbt, 4 = 81–100 % angefärbt). Der Intensitäts-Score beschreibt die Intensitäten der auftretenden Färbungen (0 = keine Anfärbung, 1 = schwache Färbung, 2 = mäßige Färbung, 3 = starke Färbung).

Die IRS-Werte von 0 bis 12 errechnen sich aus dem Produkt der beiden Scores, wobei sich eine Überexpression ab einem Wert > 4 ergibt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte die Auswertung unabhängig von zwei Personen, wobei in 97 % der Fälle Übereinstimmungen auftraten. In 3 % der Fälle traten Abweichungen bei der Auswertung auf. In diesen Fällen wurden die Proben gemeinsam gesichtet, um einen Konsens zu erlangen.

**Tab. 8: Immunreaktiver Score (Remmele-Score)**

Proportions-Score		Intensitäts-Score	
Positive Tumorzellen in Prozent		Intensität der gefärbten Tumorzellen	
0	Keine Anfärbung	0	keine Anfärbung
1	< 10 %	1	schwache Anfärbung
2	11–50 %	2	mäßige Anfärbung
3	51–80 %	3	starke Anfärbung
4	81–100 %		

- **Statistische Analyse**

Zur statistischen Analyse wurde das Statistikprogramm SPSS 16.0 eingesetzt. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt.

- **Cox-Regression**

Die Cox-Regression wurde verwendet, um den gleichzeitigen Einfluss von mehreren Variablen auf die Überlebenszeit zu untersuchen. In diesem Fall wurden die nachfolgenden Variablen untersucht:

- Geschlecht
- Alter bei Erstdiagnose
- Lage des Tumors
- Tumorgroße
- TNM-Klassifikation
- WHO-Klassifikation
- Stadium der Erkrankung
- Ki-67 und EpCAM-Expression.

Außerdem kann der Einfluss von stetigen Variablen auf die Überlebenszeit bewertet werden. Hierbei bietet die Cox-Regression die Möglichkeit, die Größe des Einflusses (Hazard Ratio, HR) abzuschätzen.

- **Univariate Cox-Regressionsanalyse**

Die univariate Cox-Regressionsanalyse gilt als Vorstufe zur multivariaten Cox-Regressionsanalyse. Diese Methode wurde gewählt, um die Einflussfaktoren auf das Überleben einzeln prüfen zu können. Beim Auftreten einer Signifikanz wurde diese Variable in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse weiter untersucht. Die Schätzung liefert als semiparametrisches Verfahren kein komplettes Vorhersagemodell für die Überlebenszeit, sondern lässt die Verteilungsfunktion der beobachteten Episodenenden unbewertet und schätzt den Einfluss metrischer oder kategorialer Variablen auf einen als über alle Fälle angenommenen als Baseline-Hazard.

- **Multivariate Cox-Regressionsanalyse mit Interaktionsvariable**

Hier wurde das Nicht-Vorhandensein von Metastasen mit dem Vorhandensein von regionalen sowie peripheren LN-Metastasen, sowie das Nicht-Vorhandensein von Fernmetastasen mit dem Auftreten von Lungen- sowie Peritonealmetastasen verglichen. Weiterhin wurde die Fragestellung nach dem Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein von LN-Metastasen und dem Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein von Fernmetastasen untersucht. Diese Variablen wurden aufgrund von signifikanten Resultaten aus der univariaten Cox-Regressionsanalyse als Variablen in die multivariate Cox-Regressionsanalyse eingebracht.

- **Ergebnisse**

- **Charakteristika der NET-Patienten**

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden die Proben von insgesamt 85 Patienten mit NET untersucht. Das Durchschnittsalter der Probanden lag bei 48,2 Jahren. Das Kollektiv bestand aus 38 Frauen und 47 Männern. Das Durchschnittsalter der Frauen betrug 55,27 Jahre und das der Männer 46,11 Jahre. Tabelle 9 bietet eine Übersicht über die Lokalisation des Primärtumors und die Häufigkeit von LN- und Fernmetastasen.

**Tab. 9: Primärtumoren, Lymphknoten-(LN)- und Fernmetastasen**

	Patienten
NET-Dickdarm	3
Gastrinom	14
Pankreas-NEN	35
<b>Lymphknotenmetastasen</b>	
Keine Angaben	4
Keine Metastasen	34
Regionale LK	4
Periphere LK	38
<b>Fernmetastasen</b>	
Keine Angaben	30
Keine Metastasen	21
Metastasen im Mesenterium	1
Lebermetastasen	22
Milzmetastasen	1
Lungenmetastasen	1
Cerebrale Metastasen	1
Ossäre Metastasen	1
Peritonealmetastasen	1
Pleurametastasen	1
Zwerchfellmetastasen	1
Perikardmetastasen	1

Die Größe des Primärtumors betrug im Mittel 4,11 cm. Tabelle 10 stellt die TNM-Stadien (s. Tab. 2) der Patienten dar. Am häufigsten waren im vorliegenden Kollektiv T2-Tumoren vertreten (N=32). Jeweils etwa die Hälfte der Patienten zeigten einen regionalen LN-Befall (N=42) bzw. keinen Befall (N=38). Auch Fernmetastasen traten bei etwa der Hälfte der Patienten (N=40) auf.

**Tab. 10: TNM-Stadium der Patienten**

<b>T-Status</b>	
T1	21
T2	32
T3	14
T4	17
<b>N-Status</b>	
N0	38
N1	42
N2	3
<b>M-Status</b>	
M0	44
M1	40

Bei den meisten Tumoren (s. Tab. 11) handelte es sich um gut differenzierte Tumoren (Grading G1, N=71, s. Tab. 4). Beim Staging (s. Tab. 3) waren alle Stadien vertreten.

Viele Patienten zeigten aber ein Stadium IV (N=31). Bei der WHO-Klassifikation (s. Tab. 5) dominierten Patienten im Stadium WHO2 (N=44).

**Tab. 11: Grading, WHO-Klassifikation und Tumorstadium**

<b>Grading</b>	
G1	71
G2	12
<b>WHO-Klassifikation</b>	
WHO-1	22
WHO-2	44
WHO-3	15
<b>Tumorstadium</b>	
I	12
IIa	8
IIb	8
IIIa	1
IIIb	17
IV	31

Weniger als die Hälfte der Tumoren (N=36) zeigten keine Ki67-Expression. Ki67-exprimierende Tumoren hatten meist einen IRS-Wert von 2 oder 3, was insgesamt für eine relativ niedrige Expression spricht (s. Kap. 2.7). Den höchsten IRS-Wert von 6 zeigte lediglich ein Tumor (s. Tab. 12).

**Tab. 12: Ki67-Expression**

<b>Ki67-Expression (IRS-Werte)</b>	<b>Anzahl</b>
0	36
1	3
2	15
3	20
4	2
5	0
6	1

37 Patienten waren am Ende des Beobachtungszeitraumes noch am Leben, wohingegen 39 verstorben waren. Das mittlere Überleben lag bei 103 Monaten.

- **EpCAM-Expression**

Die EpCAM-Expression der in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurde immunhistochemisch mit dem monoklonalen anti-EpCAM-Antikörper (Ber-Ep4) bestimmt. Von 85 Patienten wurden die NEN-Primärtumoren verschiedenen Ursprungs analysiert. Zusätzlich wurden auch 14 LN- und 9 Fernmetastasen beurteilt. Die EpCAM-Expression wurde mithilfe des IRS-Scores (s. Kap. 2.7) quantifiziert

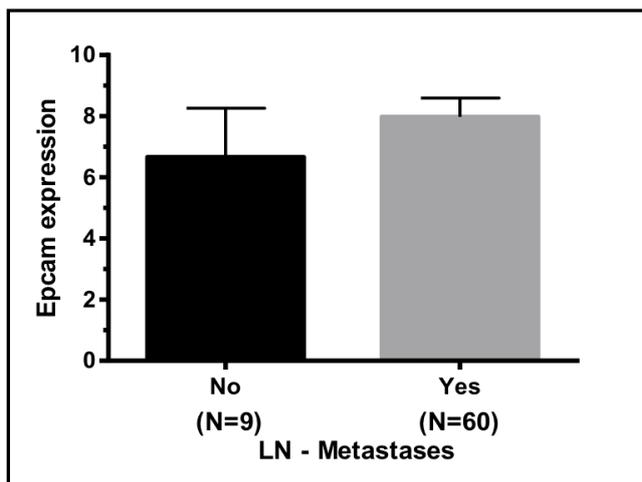
(s. Tab. 13). 20 der analysierten Proben exprimierten kein EpCAM (IRS=0). Dagegen zeigten 25 Proben mit einem IRS=12 eine sehr starke Expression.

**Tab. 13: EpCAM-Expression**

<i>EpCAM-Expression (IRS-Werte)</i>	<b>Anzahl</b>
0	20
1	3
2	0
3	2
4	4
6	10
8	9
9	0
12	25

- **EpCAM-Expression in Abhängigkeit von der Metastasierung**

Abbildung 3 vergleicht die EpCAM-Expression in Abhängigkeit vom Vorhandensein von LN-Metastasen. Die höchste EpCAM-Expression wies die Gruppe mit LN-Metastasen ( $7,983 \pm 0,6095$ ; N=60) auf. Der IRS-Score der EpCAM-Expression der Patienten ohne LN-Metastasen betrug dagegen nur  $6,667 \pm 1,599$  (N=9). Der Unterschied in der EpCAM-Expression zwischen den Gruppen von  $1,317 \pm 1,691$  war statistisch nicht signifikant (ungepaarter t-Test:  $t=0,7787$ ,  $df=67$ ,  $p=0,4389$ ).

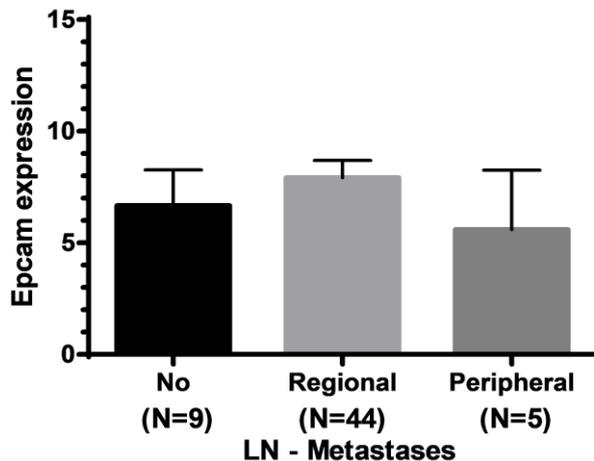


**Abb. 3: EpCAM-Expression in Abhängigkeit vom Auftreten von Lymphknoten-(LN)-Metastasen**

No = keine LN-Metastasen, Yes = LN-Metastasen

EpCAM-Expression: MW  $\pm$  SEM des IRS-Score (siehe Kap. 2.7)

Abbildung 4 vergleicht die EpCAM-Expression bei Patienten ohne LN-Metastasen (N=9) bzw. mit regionalen LN-Metastasen (N=44) und peripheren LN-Metastasen (N=5). Patienten mit regionalen LN-Metastasen besaßen die höchste EpCAM-Expression. Die statistische Auswertung ergab jedoch, dass die Patienten in den Gruppen keine signifikant unterschiedliche EpCAM-Expression (ANOVA:  $F(2/55)=0,6570$ ,  $p=0,5231$ ) aufwiesen.



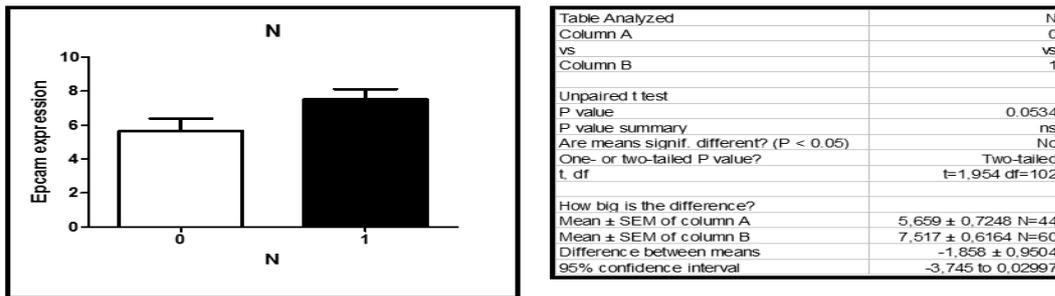
**Abb. 4: EpCAM-Expression in Abhängigkeit vom Auftreten regionaler und peripheren Lymphknoten-(LN)-Metastasen**

No = keine LN-Metastasen, Regional = regionale LN-Metastasen, peripheral = periphere LN-Metastasen

EpCAM-Expression: MW ± SEM des IRS-Score (siehe Kap. 2.7)

Abbildung 5 vergleicht die EpCAM-Expression bei Patienten mit ausschließlich regionalen LN-Metastasen (Gruppe 0; N=44) und Patienten mit LN-Metastasen unabhängig von der Lokalisation (Gruppe 1, N=60). Patienten, die ausschließlich regionalen LN-Metastasen aufwiesen, zeigten eine geringere EpCAM-Expression ( $5,659 \pm 0,7248$  versus  $7,517 \pm 0,6164$ ). Die Differenz von  $-1,858 \pm 0,9504$  war statistisch knapp nicht signifikant (ungepaarter t-Test:  $t=1,954$   $df=102$ ,  $p=0,0534$ ).

## EpCAM-Expression und Risikofaktoren



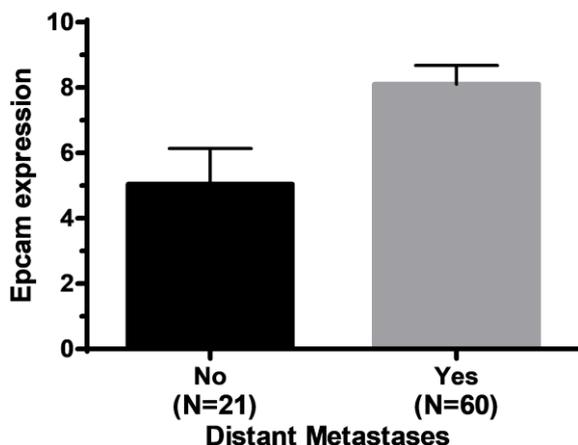
**Abb.5: EpCAM-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation der Lymphknoten-(LN)-metastasen**

Gruppe 0 = ausschließlich regionale LN-Metastasen, Gruppe 2 = LN-Metastasen unabhängig von der Lokalisation

EpCAM-Expression: MW ± SEM des IRS-Score (siehe Kap. 2.7)

Abbildung 6 zeigt die EpCAM-Expression bei Patienten mit und ohne Fernmetastasen.

In der Gruppe mit Fernmetastasen betrug die EpCAM-Expression im Mittel  $8,103 \pm 0,5756$  (N=58). In der Gruppe ohne Fernmetastasen  $5,048 \pm 1,092$  (N=21). Der Unterschied in der EpCAM-Expression ( $3,056 \pm 1,160$ ) zwischen Patienten mit und ohne Fernmetastasen war signifikant (ungepaarter t-Test:  $t=2,635$ ,  $df=77$ ,  $p=0,0102$ ).

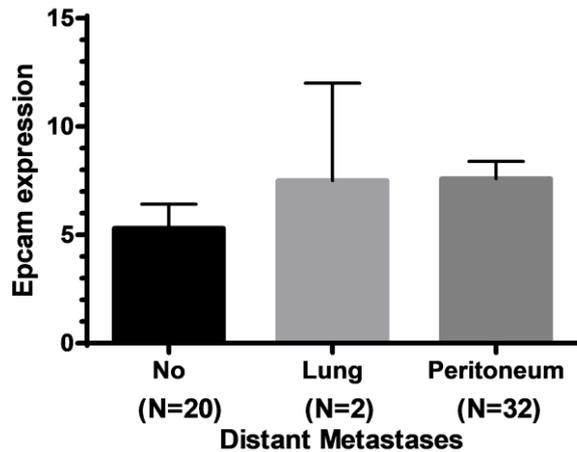


**Abb. 6: EpCAM-Expression in Abhängigkeit vom Auftreten von Fernmetastasen**

No = keine Fernmetastasen, Yes = Fernmetastasen

EpCAM-Expression: MW ± SEM des IRS-Score (siehe Kap. 2.7)

Abbildung 7 vergleicht die EpCAM-Expression von Patienten ohne Fernmetastasen (N=20) bzw. mit Lungenmetastasierung (N=2) und Peritonealkarzinose (N=32). Patienten mit Lungenmetastasierung oder Peritonealkarzinose zeigten eine vergleichbare EpCAM-Expression. Diese lag höher als bei Patienten ohne Fernmetastasen. Die Unterschiede in der EpCAM-Expression zwischen den drei Gruppen waren statistisch nicht signifikant (ANOVA:  $F(2/52)=1,464$ ,  $p=0,2408$ ).

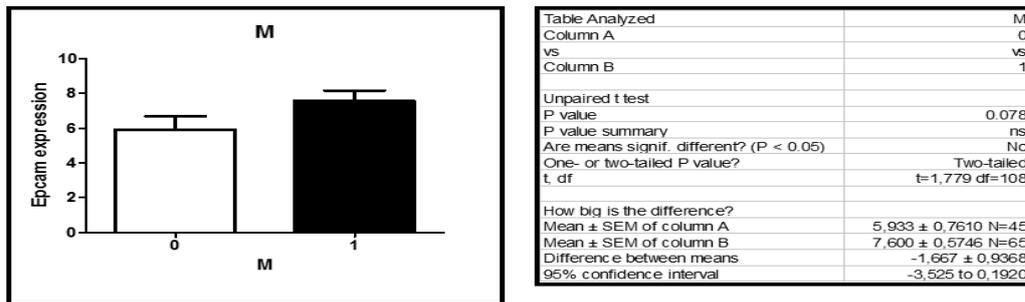


**Abb. 7: EpCAM-Expression beim Auftreten von Fernmetastasen in der Lunge und im Peritoneum**

No = keine Metastasen, Lung = Lungenmetastasen, Peritoneum = Metastasen im Peritoneum  
 EpCAM-Expression: MW ± SEM des IRS-Score (siehe Kap. 2.7)

Abbildung 8 vergleicht die EpCAM-Expression bei Patienten mit ausschließlich regionalen Fernmetastasen (Gruppe 0; N=45) und Patienten mit Fernmetastasen unabhängig von der Lokalisation (Gruppe 1, N=65). Patienten, die ausschließlich regionale Fernmetastasen aufwiesen zeigten eine geringere EpCAM-Expression ( $5,933 \pm 0,7610$  versus  $7,600 \pm 0,5746$ ). Die Differenz von  $-1,667 \pm 0,9368$  war statistisch nicht signifikant (ungepaarter t-Test:  $t=1,779$   $df=108$ ,  $p=0,078$ ).

## Epcam-Expression und Risikofaktoren



### **Abb. 8: EpCAM-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation der Fernmetastasen**

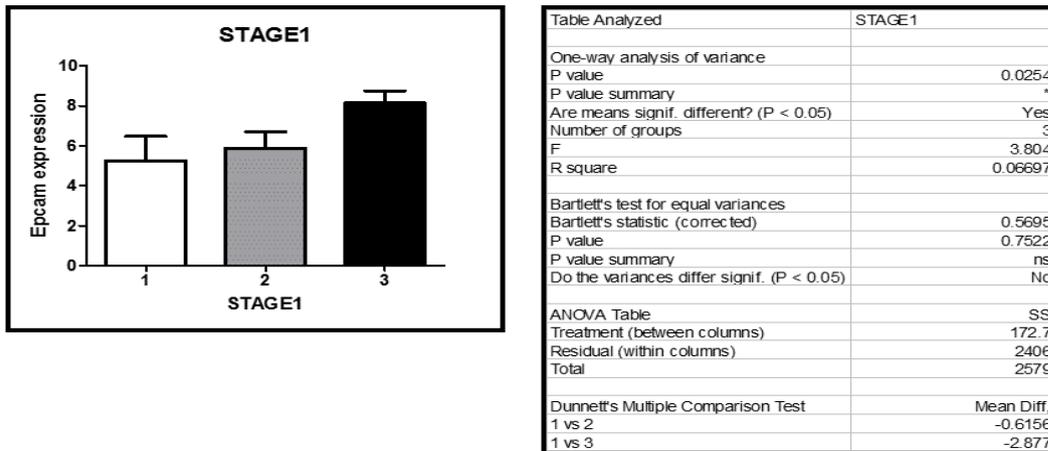
Gruppe 0 = ausschließlich regionale Fernmetastasen, Gruppe 2 = Fernmetastasen unabhängig von der Lokalisation

EpCAM-Expression: MW ± SEM des IRS-Score (siehe Kap. 2.7)

- **EpCAM-Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium**

Abbildung 9 vergleicht die EpCAM-Expression in den klassifizierten Stadien der Tumoren. Die Stadien I-IIa wurden in Gruppe 1 zusammengefasst. Gruppe 2 umfasst die Stadien IIb–IIIb und Gruppe 3 entspricht Stadium IV (s. Tab. 3). Deutlich wird, dass mit zunehmendem Stadium die EpCAM-Expression zunahm. Die höchste Expression wies die Gruppe 3 auf. Die EpCAM-Expression in den Gruppen war signifikant verschieden (ANOVA:  $F=3,804$ ,  $p=0,0254$ ).

## EpCAM-Expression und Risikofaktoren

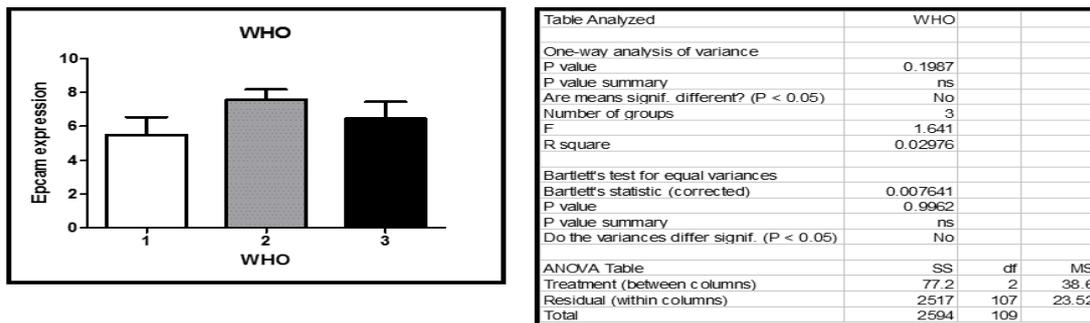


**Abb. 9: EpCAM-Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium**  
 Gruppe 1: Stadien I–IIa, Gruppe 2: Stadien IIb–IIIb, Gruppe 3 IV (s. Tab. 3)  
 EpCAM-Expression: MW ± SEM des IRS-Score (siehe Kap. 2.7)

- **EpCAM-Expression in Abhängigkeit von der WHO-Klassifikation**

Abbildung 10 vergleicht die EpCAM-Expression in den Gruppen der WHO-Klassifikation (Gruppe 1: neuroendokrine Neoplasie Grad 1, Gruppe 2: neuroendokrine Neoplasie Grad 2, Gruppe 3: neuroendokrines Karzinom Grad 3 (s. Tab. 5)). Deutlich wird, dass neuroendokrine Neoplasien Grad 2 die höchste EpCAM-Expression zeigten. Die höchste Expression wies die Gruppe 3 auf. Die EpCAM-Expression in den Gruppen war aber nicht signifikant verschieden (ANOVA:  $F=1,641$ ,  $p=0,1987$ ). Mit dem Bartlett's-Test wurde die Varianzhomogenität der Gruppen geprüft. Bei einem  $p=0,9962$  ist davon auszugehen, dass sich die Varianzen in den Gruppen nicht signifikant unterscheiden.

## EpCAM-Expression und Risikofaktoren



**Abb. 10: EpCAM-Expression in Abhängigkeit von der WHO-Klassifikation**

1: neuroendokrine Neoplasie Grad 1, 2: neuroendokrine Neoplasie Grad 2, 3: neuroendokrines Karzinom Grad 3 (s. Tab. 5)

EpCAM-Expression: MW ± SEM des IRS-Score (siehe Kap. 2.7)

- **Einflussfaktoren auf die Überlebenszeit**
- **Cox-Regressionsanalyse (univariate Analyse)**

Mit Hilfe der Cox-Regressionsanalyse wurden die potentiellen Einflussfaktoren auf das Überleben der Patienten des vorliegenden Kollektivs mit GEP-NEN analysiert. Als Parameter wurden das Geschlecht, das Alter bei Erstdiagnose, die Lage des Tumors, das Vorhandensein von LN- und distalen Metastasen, die Tumorgöße, die TNM-Klassifikation, die WHO-Klassifizierung, das Stadium der Erkrankung sowie die Ki-67- und EpCAM-Expression untersucht (s. Tab. 14). Eine Tumorgöße > 1,5 cm erhöhte das Mortalitätsrisiko um mehr als den Faktor 2 (HR=2,132). Einen deutlichen negativen Effekt auf das Überleben hatte auch eine erhöhte Ki-67-Expression >3 (HR=1,984). Alle in das Modell einbezogenen Faktoren, bis auf eine EpCAM-Expression >4 erhöhten das Risiko zu versterben (H=0,561). Signifikante Ergebnisse ergaben der LN-Status (p=0,043), die Ki-67-Expression (p=0,0297) und die WHO-Klassifikation (p=0,033). Die EpCAM-Expression verfehlte mit einem p=0,0810 knapp die statistische Signifikanz.

**Tab. 14: Potentielle Einflussfaktoren auf das Überleben (univariate Cox-Regressionsanalyse)**

Variable	HR	P	N	BP
Geschlecht	1,376	0,3076	85	-
Alter bei Erstdiagnose	1,551	0,1750	85	50 Jahre
Lokalisation: <i>for-, mid-, hindgut</i>	0,618	0,1930	85	-
Lokalisation: Pankreas, Darm, andere	1,031	0,8990	84	-
Lokalisation: Darm, Pankreas, andere	1,740	0,0560	84	-
Lymphknoten-Metastasen	1,833	0,1110	50	-
Fernmetastasen	1,025	0,8090	56	-
Tumorgröße	2,132	0,1510	84	1,5 cm
T-Status	1,337	0,0570	85	-
N-Status	1,764	<b>0,0430</b>	85	-
M-Status	1,842	0,0630	84	-
Ki-67-Expression	1,984	<b>0,0297</b>	85	3,0**
WHO-Klassifikation	1,666	<b>0,0330</b>	85	-
Tumor-Stadium*	1,414	0,0930	85	-
EPCAM-Expression	0,561	0,0810	78	4,0**

Legende: HR: *Hazard Ratio*; P: P-Wert; N: Anzahl der Patienten; BP: *Breakpoint*

\* Gruppe 1: Stadien I–IIa, Gruppe 2: Stadien IIb–IIIb, Gruppe 3 IV (s. Tab. 3)

\*\* IRS-Score (siehe Kap. 2.7)

Die P-Werte signifikanter Einflussfaktoren sind farblich markiert.

#### • **Multivariate Cox-Regressionsanalyse mit Interaktionsvariable**

Im Anschluss wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse zur Identifikation von Einflussfaktoren auf das Überleben nach Erstdiagnose durchgeführt (s. Tab. 15). Dabei konnten lediglich der LN-Status ( $p=0,0226$ ) und die Lokalisation des Primarius (Darm vs. Pankreas vs. andere,  $p=0,0138$ ) als signifikante Faktoren identifiziert werden. Wiederum erwies sich die EpCAM-Expression nicht als signifikanter Prognosefaktor ( $p=0,123$ ). Alle in das Modell einbezogenen Faktoren, bis auf eine EpCAM-Expression  $>4$  erhöhten das Risiko zu versterben. Den stärksten Effekt zeigt mit einer HR=2,759 eine Tumorgröße  $>1,5$  cm. Wie schon in der univariaten Analyse erwies sich die EpCAM-Expression als protektiv (HR=0,586).

**Tab. 15: Multivariate Analysen zum Überleben nach Erstdiagnose**

Variablen im Angebot	HR	P	N	BP
Geschlecht	-	-	76	-
Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	1,866	0,0893	76	50 Jahre
Lokalisation: Darm, Pankreas, andere	2,163	<b>0,0138</b>	76	-
Tumorgröße	2,759	0,0735	76	1,5 cm
T-Status	-	-	76	-
N-Status	2,080	<b>0,0226</b>	76	-

M-Status	-	-	76	-
Ki-67-Expression	-	-	76	3,0**
WHO-Klassifikation	-	-	76	-
Tumorstadium*	-	-	76	-
EPCAM-Expression	0,586	0,1234	76	4,0**

Legende: HR: *Hazard Ratio*; P: P-Wert; N: Anzahl der Patienten; BP: *Breakpoint*

\* Gruppe 1: Stadien I–IIa, Gruppe 2: Stadien IIb–IIIb, Gruppe 3 IV (s. Tab. 3)

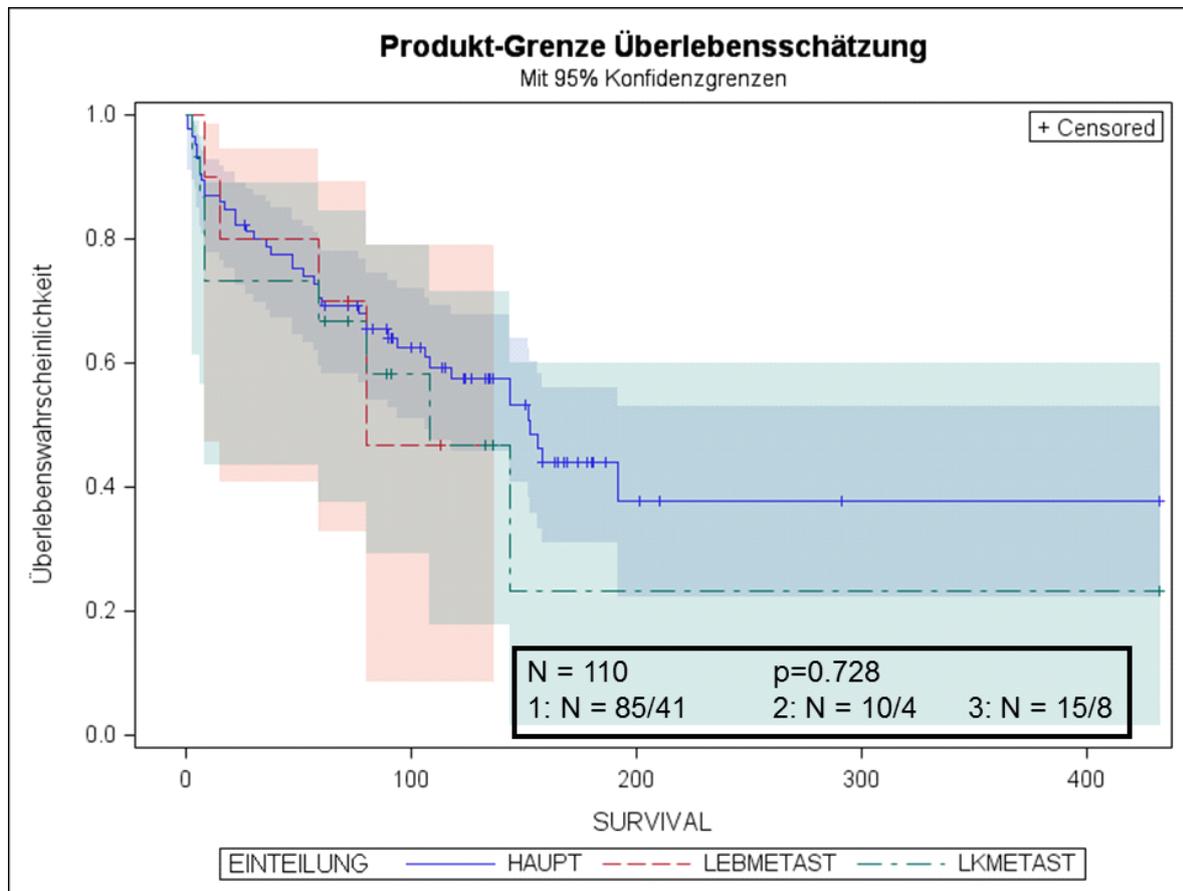
\*\* IRS-Score (siehe Kap. 2.7)

Die P-Werte signifikanter Einflussfaktoren sind farblich markiert.

**Bemerkung:** Variablen, die mit einem „-“ bei HR und P wurden im BACKWARDS-Verfahren wegen Überschreitung des 15 %-Niveaus eliminiert.

- **Einfluss der Metastasierung auf das Überleben**

Abbildung 11 zeigt das Überleben in Abhängigkeit vom Vorhandensein von LN- oder Leber-Metastasen.



**Abb. 11: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Leber- oder Lymphknoten-(LN)-metastasen (Kaplan-Meier-Kurve)**

3 (grün gestrichelte Kurve): Patienten mit LN-Metastasen, 2 (rote Kurve): Patienten mit Lebermetastasen, 1 (blaue Kurve): Gesamtkollektiv

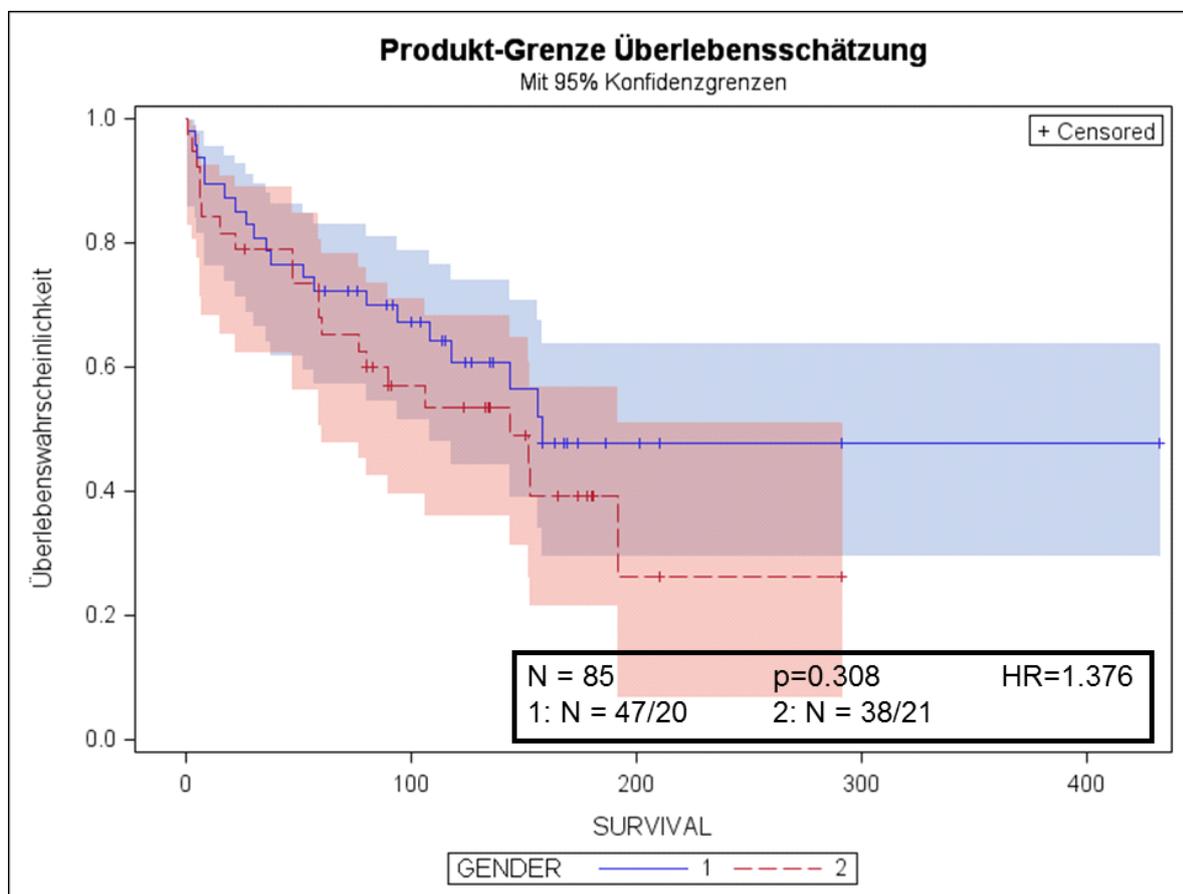
Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.

HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

Im Beobachtungszeitraum verstarben insgesamt 41 von 85 Patienten (blaue Linie). Von den zehn Patienten mit Lebermetastasen verstarben vier und von den 15 Patienten mit LN-Metastasen acht Patienten. Die Kaplan-Meier-Kurve lässt vermuten, dass Patienten mit Metastasen ein tendenziell größeres Risiko besaßen, im Beobachtungszeitraum zu versterben. Das Risiko zwischen Patienten mit LN- und Lebermetastasen war jedoch im Vergleich zum Gesamtkollektiv nicht signifikant höher ( $p=0,728$ ).

- **Einfluss des Geschlechts auf das Überleben**

Die Kaplan-Meier Kurve in Abbildung 12 verdeutlicht, dass die weiblichen Patienten (21 von 38) im Vergleich zu den männlichen Patienten (20 von 47) ein tendenziell größeres Risiko ( $HR=1,376$ ) besaßen, im Beobachtungszeitraum zu versterben. Dieses Risiko war jedoch mit einem  $p=0,308$  nicht signifikant verschieden.



**Abb. 12: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Geschlecht (Kaplan-Meier-Kurve)**

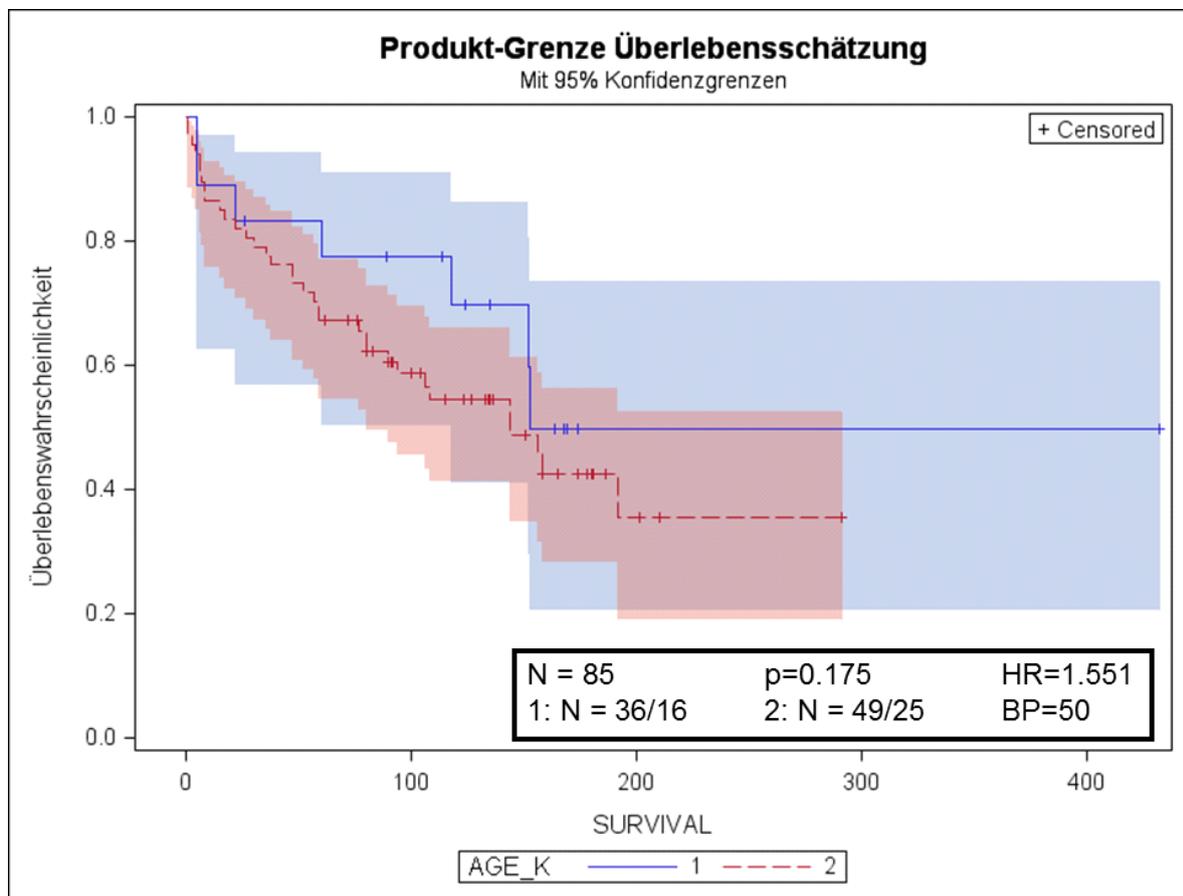
1 (blaue Kurve): männliche Patienten, 2 (rote Kurve): weibliche Patienten

Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.

HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

- **Einfluss des Alters auf das Überleben**

Die Kaplan-Meier Kurve in Abbildung 13 verdeutlicht, dass Patienten > 50 Jahre (25 von 49) im Vergleich zu den Patienten ≤ 50 Jahre (16 von 36) ein tendenziell größeres Risiko besaßen, im Beobachtungszeitraum zu versterben. Dieses Risiko war jedoch mit einem  $p=0,175$  nicht signifikant verschieden.



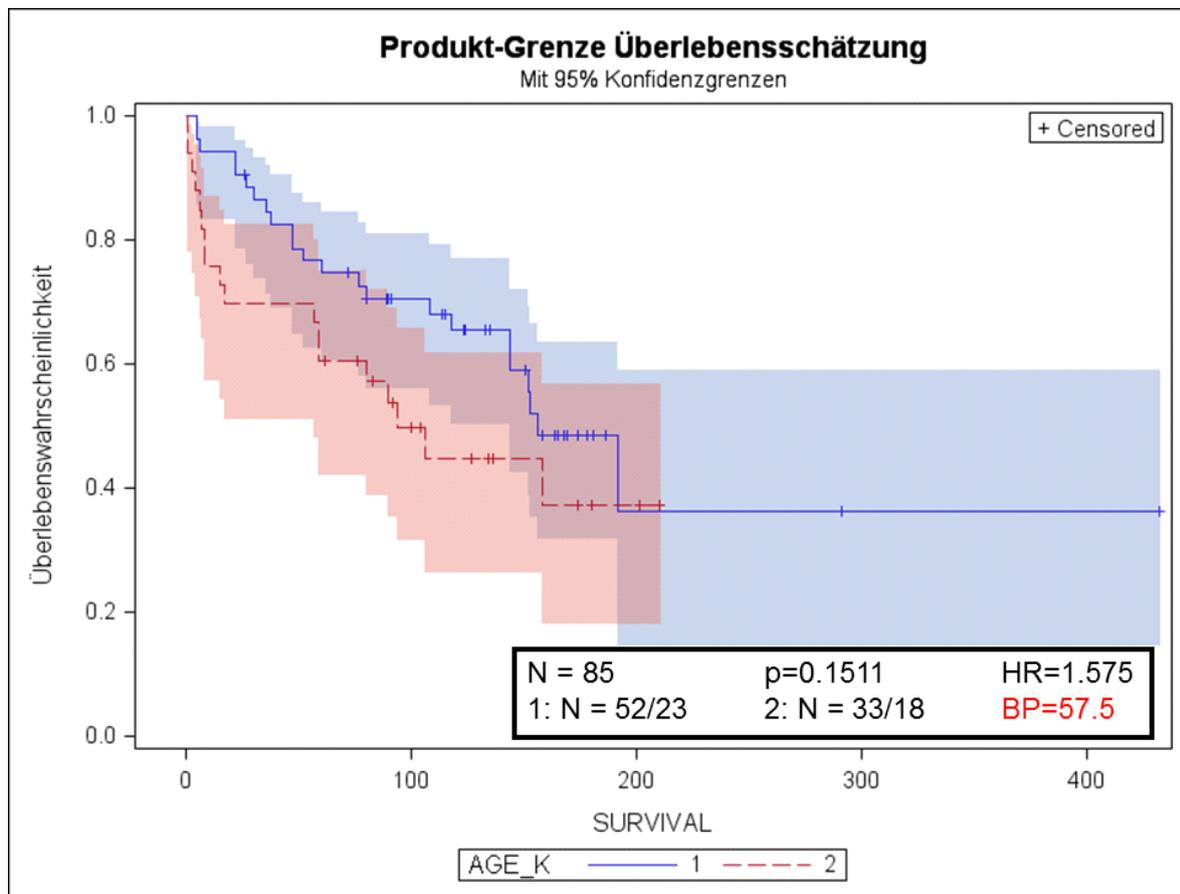
**Abb. 13: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Alter (Kaplan-Meier-Kurve) – Vergleich von Patienten ≤ 50 Jahre vs. > 50 Jahre**

1 (blaue Kurve): Patienten ≤ 50 Jahre, 2 (rote Kurve): Patienten > 50 Jahre

Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.

BP = Breakpoint (Jahre), HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

Auch bei einer Festlegung des Breakpoints auf 57,5 Jahre zeigten ältere Patienten ein größeres Risiko früher zu versterben ( $HR=1,575$ ). Dieses Risiko war jedoch mit einem  $p=0,1511$  wiederum nicht signifikant verschieden (s. Abb. 13).



**Abb. 14: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Alter (Kaplan-Meier-Kurve) – Vergleich von Patienten ≤ 57,5 Jahre vs. > 57,5 Jahre**

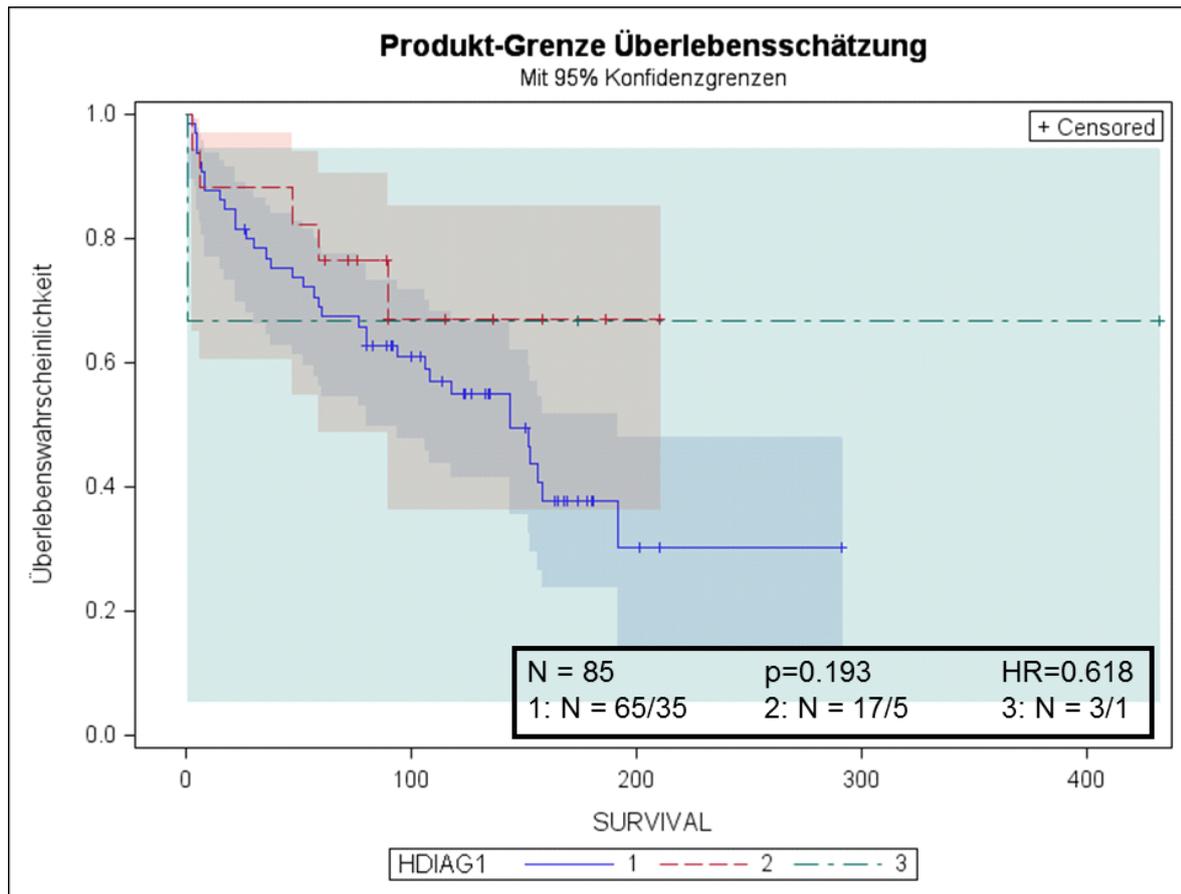
1 (blaue Kurve): Patienten ≤ 57,5 Jahre, 2 (rote Kurve): Patienten > 57,5 Jahre

Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.

BP = Breakpoint (Jahre), HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

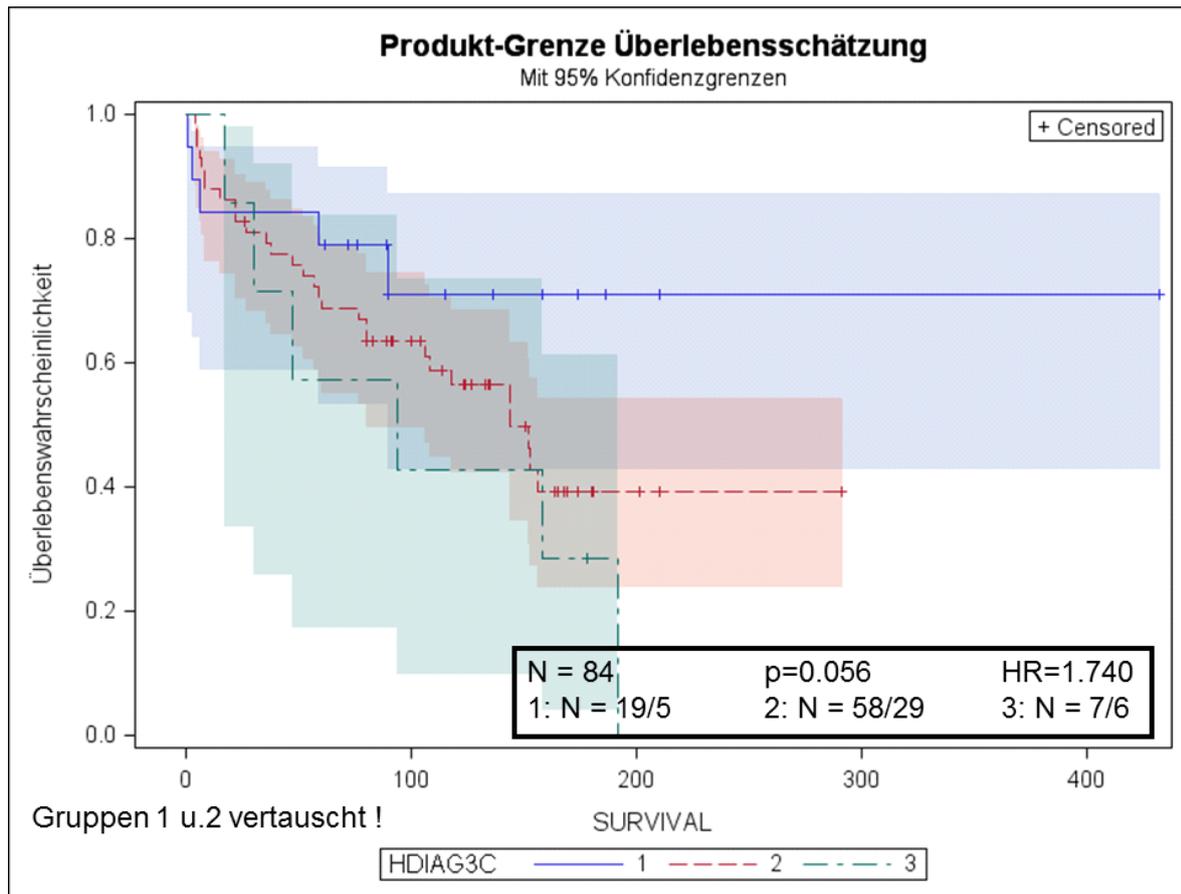
- **Einfluss der Lokalisation der Tumoren**

Abbildung 15 stellt das Überleben der Patienten im Beobachtungszeitraum in Abhängigkeit von der Lokalisation (foregut, midgut, hindgut) der Tumoren dar.



**Abb. 15: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation (Kaplan-Meier-Kurve) – Vergleich von Patienten mit *fore-*, *mid* und *hindgut* Tumoren**  
 1 (blaue Kurve): *foregut*, 2 (rote Kurve): *midgut*, 3 (grüne Kurve): *hindgut*  
 Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.  
 HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

Die Kaplan-Meier Kurve verdeutlicht, dass Patienten mit foregut-Tumoren (35 von 65) ein tendenziell größeres Mortalitätsrisiko besaßen. Bei der Interpretation der Daten sollte aber berücksichtigt werden, dass die Subgruppe mit hindgut-Tumoren sehr klein war. Laut statistischer Analyse war das Mortalitätsrisiko in den Gruppen nicht signifikant verschieden ( $p=0,193$ ).

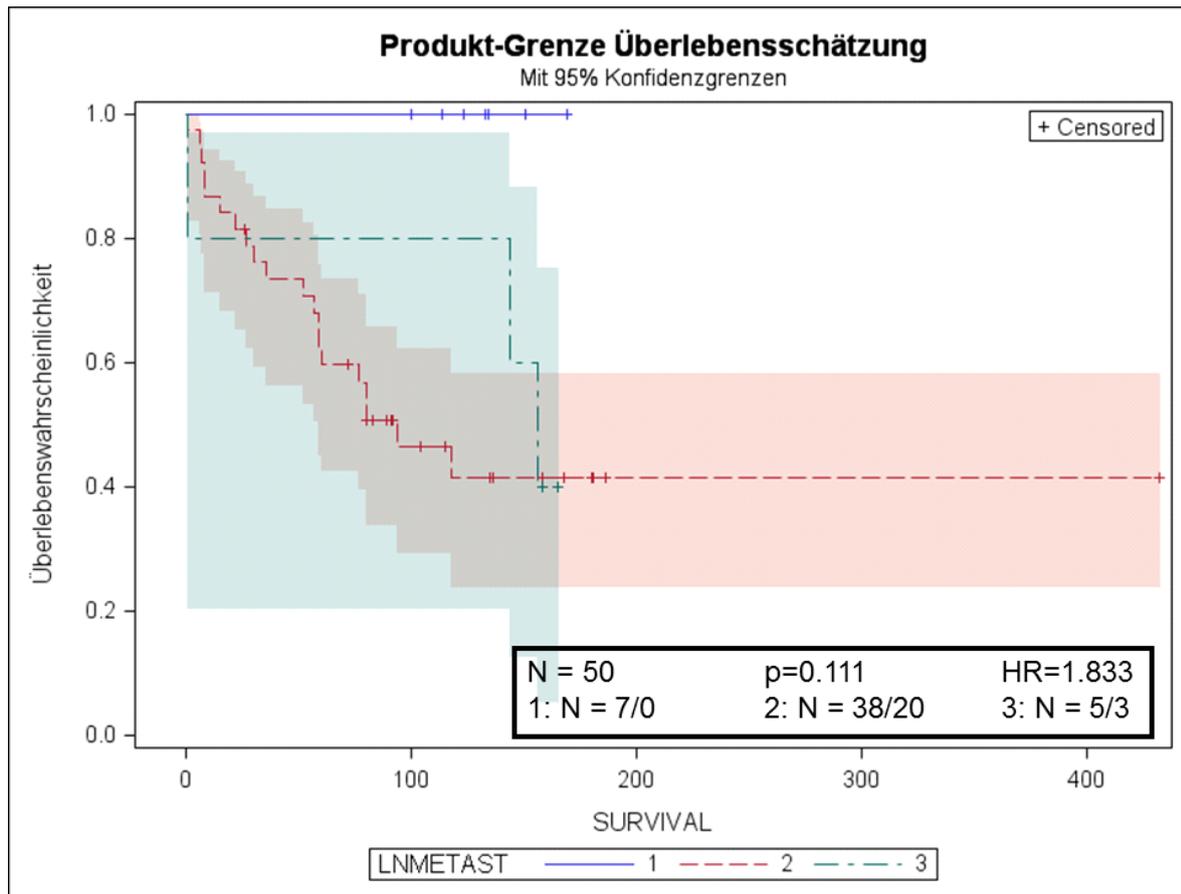


**Abb. 16: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation (Kaplan-Meier-Kurve) – Vergleich von Patienten mit Darm-, Pankreas- und Tumoren anderer Lokalisation**  
1 (blaue Kurve): Darm-Tumoren, 2 (rote Kurve): Pankreas-Tumoren, 3 (grüne Kurve): andere Lokalisation  
Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.  
HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

Die Kaplan-Meier Kurve verdeutlicht, dass Patienten mit Darm-Tumoren (6 von 7) im Vergleich zu den Patienten mit Pankreas-Tumoren (5 von 19) und Patienten mit Tumoren anderer Lokalisationen (29 von 58) ein tendenziell niedrigeres Risiko besaßen, im Beobachtungszeitraum zu versterben ( $p=0,056$ ).

- **Einfluss von LN-Metastasen auf das Überleben**

Abbildung 17 vergleicht das Überleben der Patienten mit und ohne LN-Metastasen.



**Abb. 17: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Auftreten von Lymphknoten-(LN)-Metastasen (Kaplan-Meier-Kurve)**

1 (blaue Kurve): Patienten ohne LN-Metastasen, 2 (rote Kurve): Patienten mit regionalen LN-Metastasen, 3 (grüne Kurve): Patienten mit peripheren LN-Metastasen

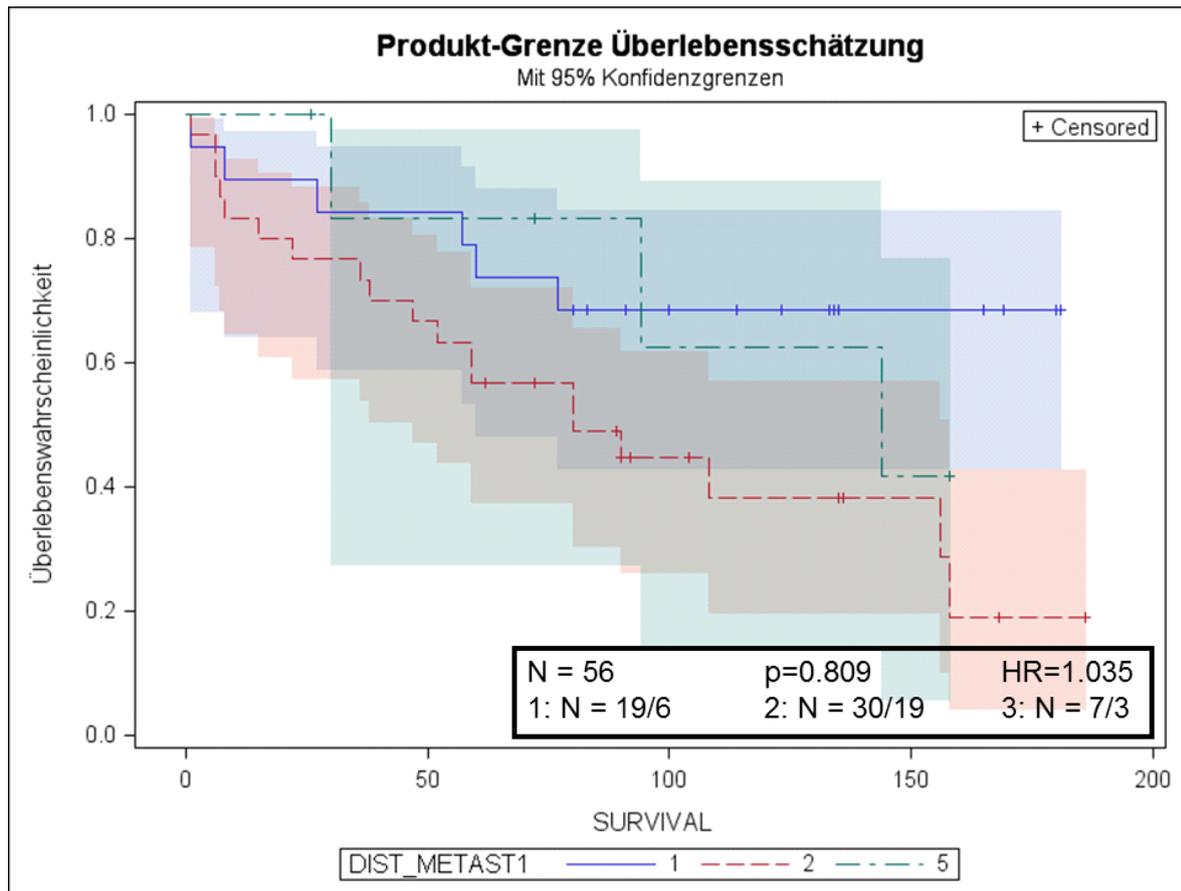
Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.

HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

Die Kaplan-Meier Kurve verdeutlicht, dass Patienten mit peripheren LN-Metastasen (3 von 5) im Vergleich zu den Patienten mit regionalen LN-Metastasen (20 von 38) ein tendenziell größeres Risiko besaßen, im Beobachtungszeitraum zu versterben. Keiner der Patienten ohne LN-Metastasen (N=7) verstarb in dem Beobachtungszeitraum. Das Mortalitätsrisiko war jedoch mit einem  $p=0,111$  zwischen den Gruppen nicht signifikant verschieden.

- **Einfluss von Fernmetastasen auf das Überleben**

Abbildung 18 vergleicht das Überleben der Patienten mit und ohne Fernmetastasen.



**Abb. 18: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Auftreten von Fernmetastasen (Kaplan-Meier-Kurve)**

1 (blaue Kurve): Patienten ohne Fernmetastasen, 2 (rote Kurve): Patienten mit regionalen Fernmetastasen, 3 (grüne Kurve): Patienten mit peripheren Fernmetastasen

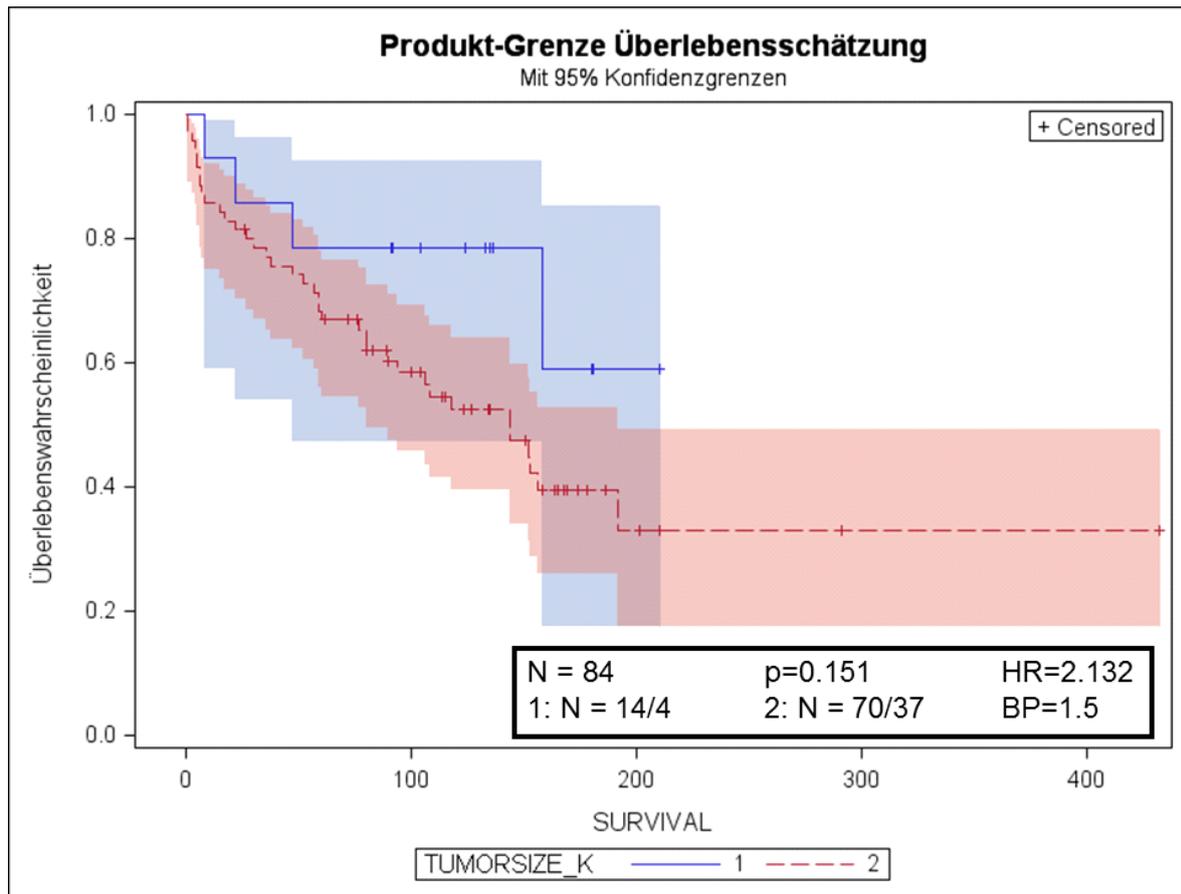
Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.

HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

Laut Kaplan-Meier Kurve schienen die Patienten mit regionalen Fernmetastasen (19 von 30) im Vergleich zu den anderen Gruppen das größte Mortalitätsrisiko zu besitzen. Das Risiko war jedoch mit einem HR=1,035 vergleichbar und nicht signifikant verschieden (p=0,809).

- **Einfluss der Tumorgöße auf das Überleben**

Abbildung 19 vergleicht das Überleben von Patienten mit Tumoren  $\leq 1,5$  cm und  $> 1,5$  cm.



**Abb. 19: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der Tumorgöße (Kaplan-Meier-Kurve)**

1 (blaue Kurve): Tumorgöße  $\leq 1,5$  cm, 2 (rote Kurve): Tumorgöße  $> 1,5$  cm

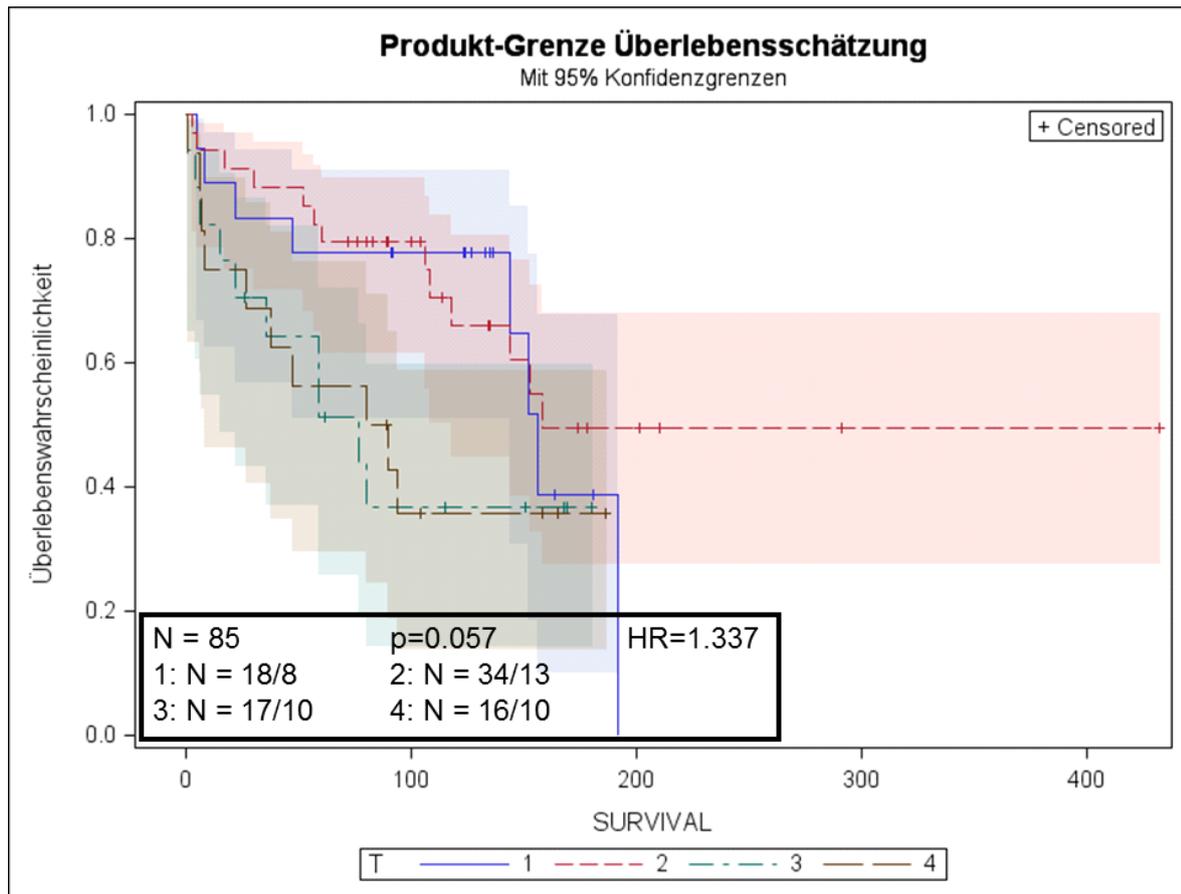
Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.

BP = Breakpoint (cm), HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

Die Kaplan-Meier Kurve verdeutlicht, dass Patienten mit Tumoren  $> 1,5$  cm (37 von 70) im Vergleich zu Patienten mit Tumoren  $\leq 1,5$  cm (4 von 14) ein etwa doppelt so großes Risiko besaßen, im Beobachtungszeitraum zu versterben (HR=2,132). Der Unterschied zwischen den Gruppen war jedoch mit einem  $p=0,151$  nicht signifikant.

- **Einfluss der Parameter der TNM-Klassifikation auf das Überleben**

Abbildung 20–22 vergleichen das Überleben von Patienten nach den Kriterien der TNM-Klassifikation (s. Tab. 2).



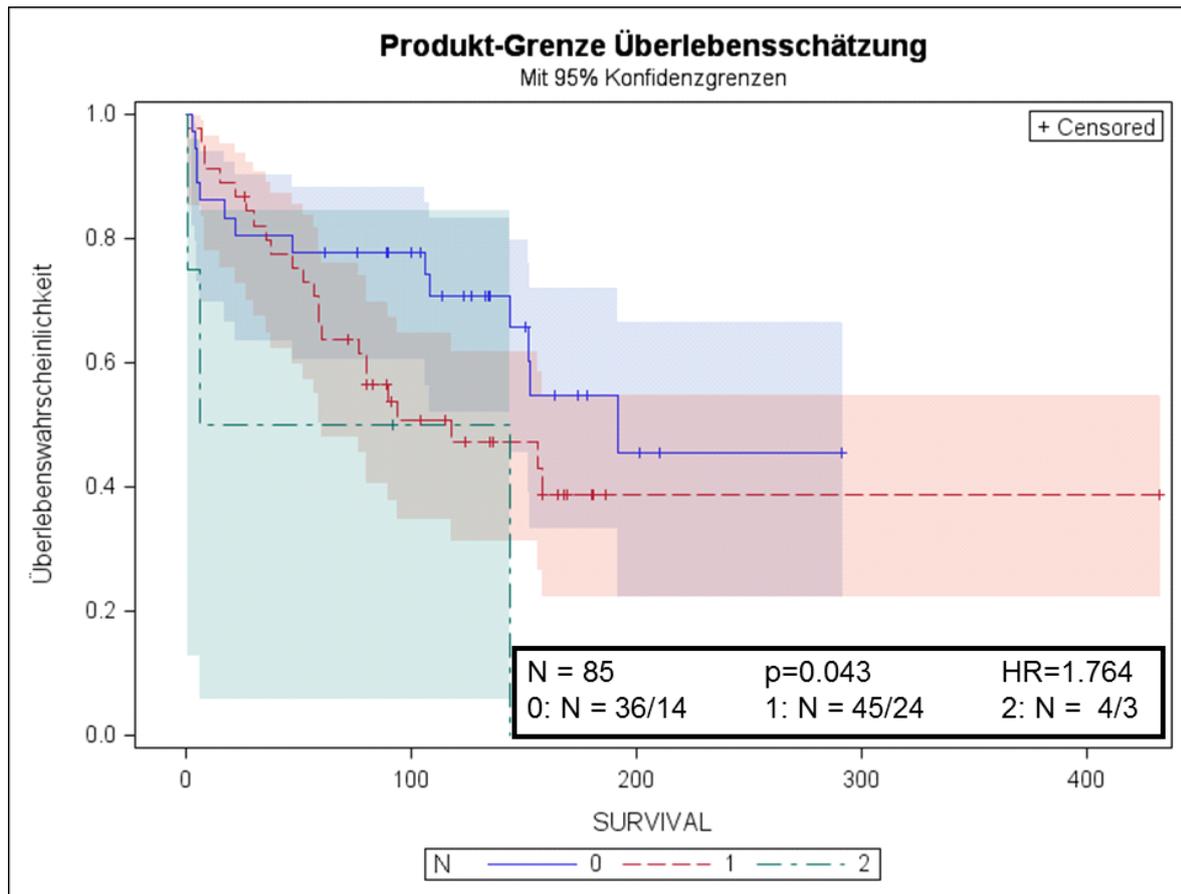
**Abb. 20: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der TNM-Stadieneinteilung für kolorektale NET (Kaplan-Meier-Kurve) – T-Parameter**

1 (blaue Kurve): T1, 2 (rote Kurve): T2, 3 (grüne Kurve) T3, 4 (braune Kurve) T4 (s. Tab. 2)

Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.

HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

Laut Kaplan-Meier-Kurve schienen Patienten mit einem T1 oder T2 Stadium ein deutlich geringeres Risiko zu besitzen, im Beobachtungszeitraum zu versterben, als Patienten mit einem T3 oder T4 Stadium. Die Unterschiede in den Gruppen waren jedoch nicht signifikant (s. Abb. 20).



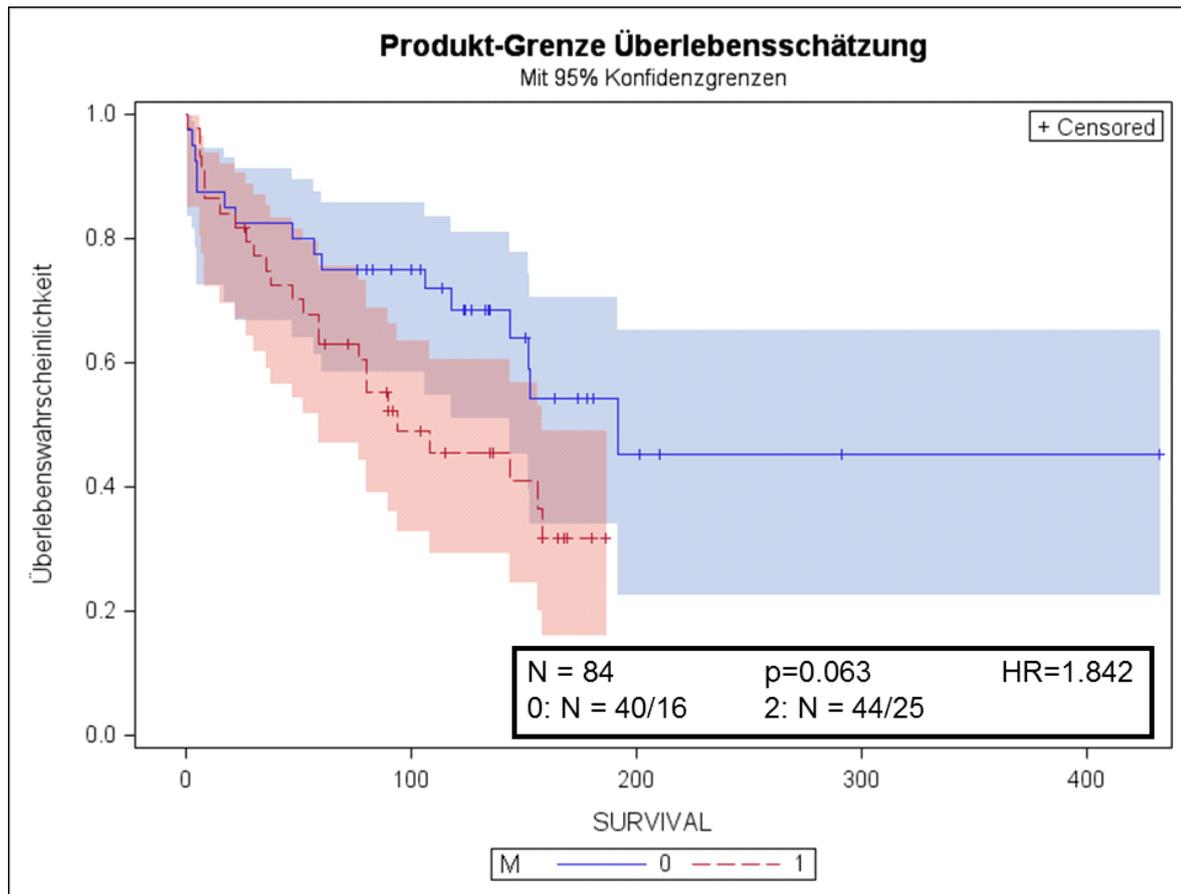
**Abb. 21: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der TNM-Stadieneinteilung für kolorektale NET (Kaplan-Meier-Kurve) – N-Parameter**

1 (blaue Kurve): NX, 2 (rote Kurve): N0, 3 (grüne Kurve) N1, (s. Tab. 2)

Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.

HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

Mit steigendem N-Stadium nahm das Risiko, im Beobachtungszeitraum zu versterben zu. Dieser Effekt war mit einem  $p=0,043$  auch statistisch signifikant (s. Abb. 21).

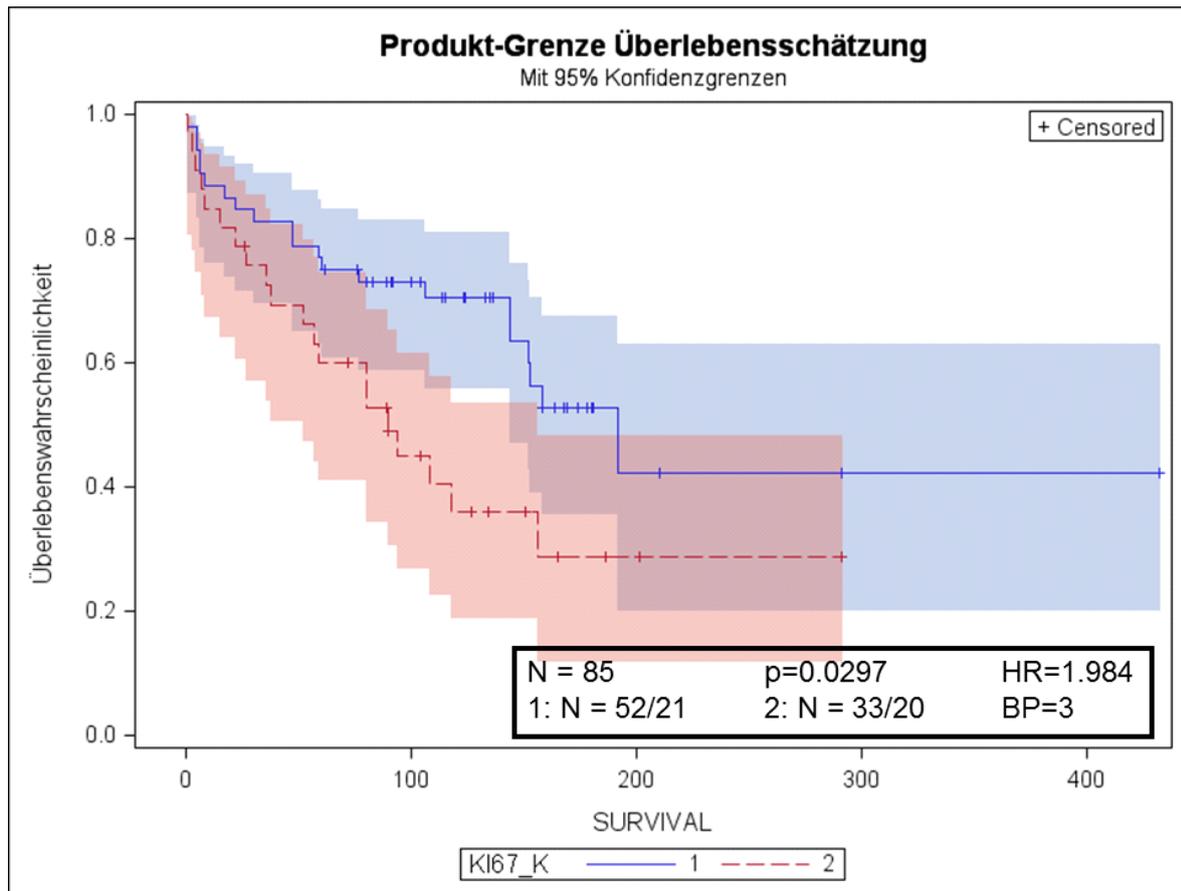


**Abb. 22: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der TNM-Stadieneinteilung für kolorektale NET (Kaplan-Meier-Kurve) – M-Parameter**  
 1 (blaue Kurve): M0, 2 (rote Kurve): M1 (s. Tab. 2)  
 Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.  
 HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

Mit steigendem M-Stadium nahm das Risiko, im Beobachtungszeitraum zu versterben zu. Dieser Effekt war mit einem  $p=0,063$  knapp nicht statistisch signifikant (s. Abb. 22).

- **Einfluss der Ki-67-Expression auf das Überleben**

Abbildungen 23 und 24 vergleichen das Überleben von Patienten in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression der Tumorzellen.



**Abb. 23: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression (Kaplan-Meier-Kurve) – Patienten mit IRS-Score Werten  $\leq 3$  versus  $> 3$**

1 (blaue Kurve): Ki-67-Expression  $\leq 3$ , 2 (rote Kurve): Ki-67-Expression  $> 3$

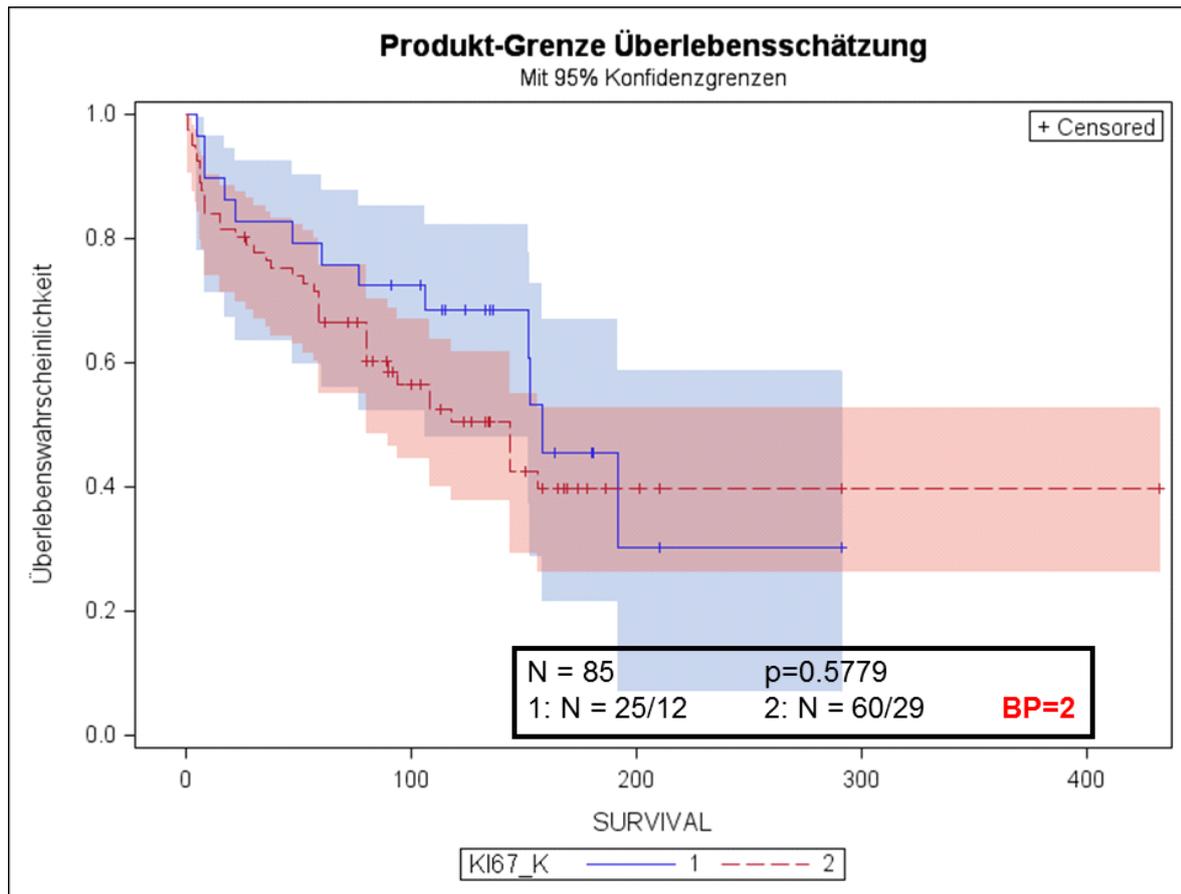
Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.

HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

BP = *Breakpoint* IRS-Score (siehe Kap. 2.7)

Patienten mit einer Ki-67-Expression  $\leq 3$  zeigten ein besseres Überleben im Vergleich zu Patienten mit einer Ki-67-Expression  $> 3$ . In der Gruppe mit der höheren Ki-67-Expression lag das Risiko fast doppelt so hoch (HR=1,984). Dieser Unterschied war mit einem  $p=0,0297$  signifikant (s. Abb. 23).

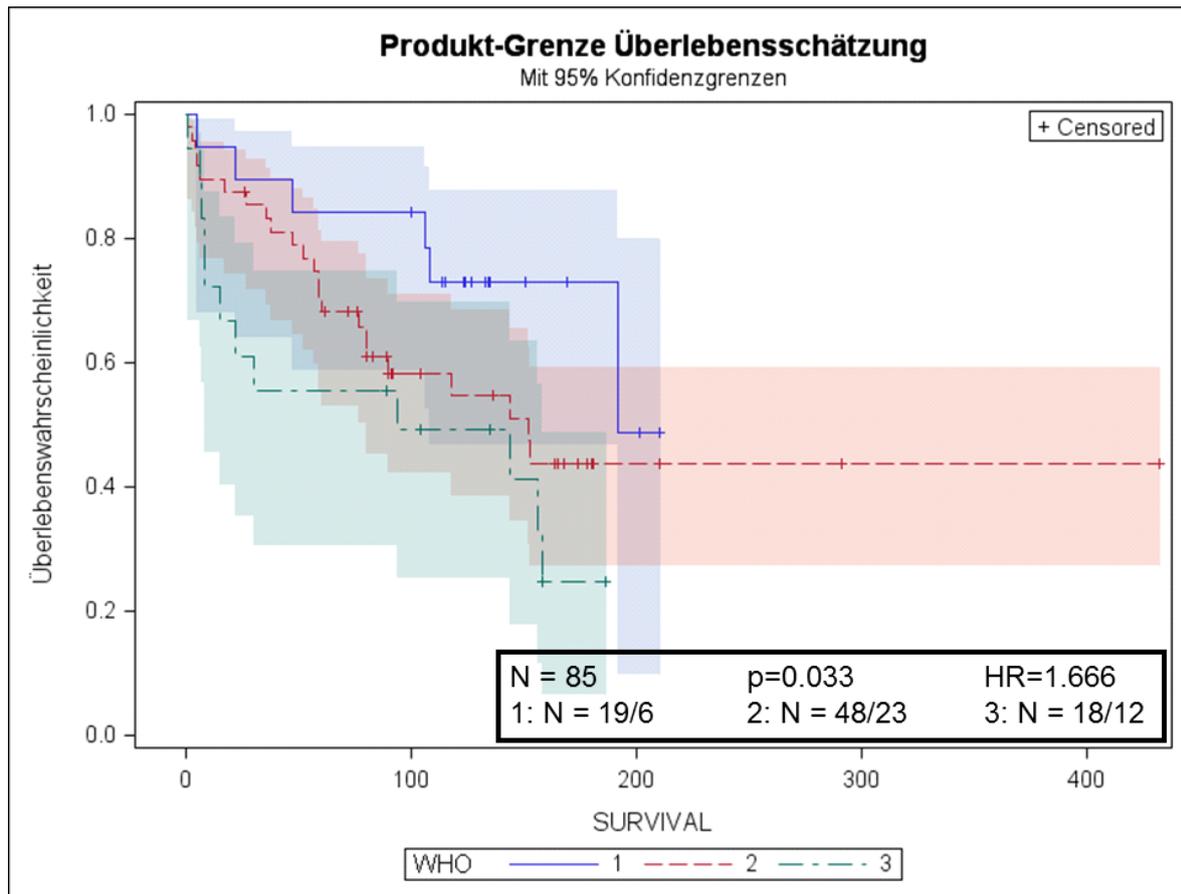
Bei einer Aufteilung der Patienten in Gruppen mit einer Ki-67-Expression  $\leq 2$  und  $> 2$  näherten sich die Kurven an (s. Abb. 24). Der Unterschied bezüglich des Mortalitätsrisikos war nicht mehr signifikant ( $p=0,5779$ ).



**Abb. 24: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression (Kaplan-Meier-Kurve) – Patienten mit IRS-Score Werten  $\leq 2$  versus  $> 2$**   
 1 (blaue Kurve): Ki-67-Expression  $\leq 2$ , 2 (rote Kurve): Ki-67-Expression  $> 2$   
 Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.  
 HR = Hazard Ratio, N = Anzahl  
 BP = *Breakpoint* IRS-Score (siehe Kap. 2.7)

- **Einfluss des WHO-Stadiums auf das Überleben**

Abbildung 25 vergleicht das Überleben von Patienten in Abhängigkeit vom WHO-Stadium.



**Abb. 25: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom WHO-Stadium (Kaplan-Meier-Kurve)**

1 (blaue Kurve): G1, 2 (rote Kurve): G2, 3 (grüne Kurve): G3.

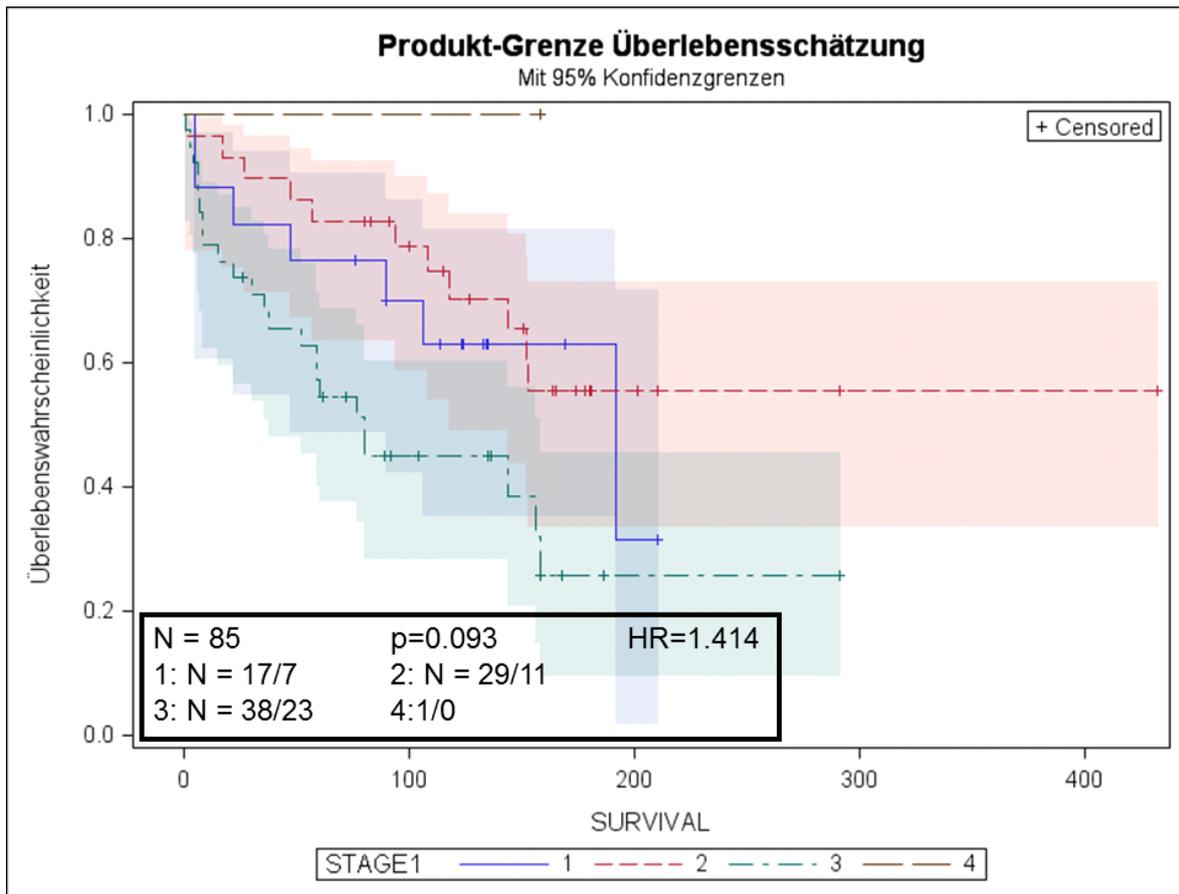
Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.

HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

Mit steigendem WHO-Stadium nahm das Mortalitätsrisiko der Patienten zu. Die Unterschiede waren mit einem  $p=0,033$  signifikant.

- **Einfluss des *Stagings* auf das Überleben**

Die Abbildungen 26 und 27 vergleichen das Überleben von Patienten in Abhängigkeit vom Staging des Tumors.



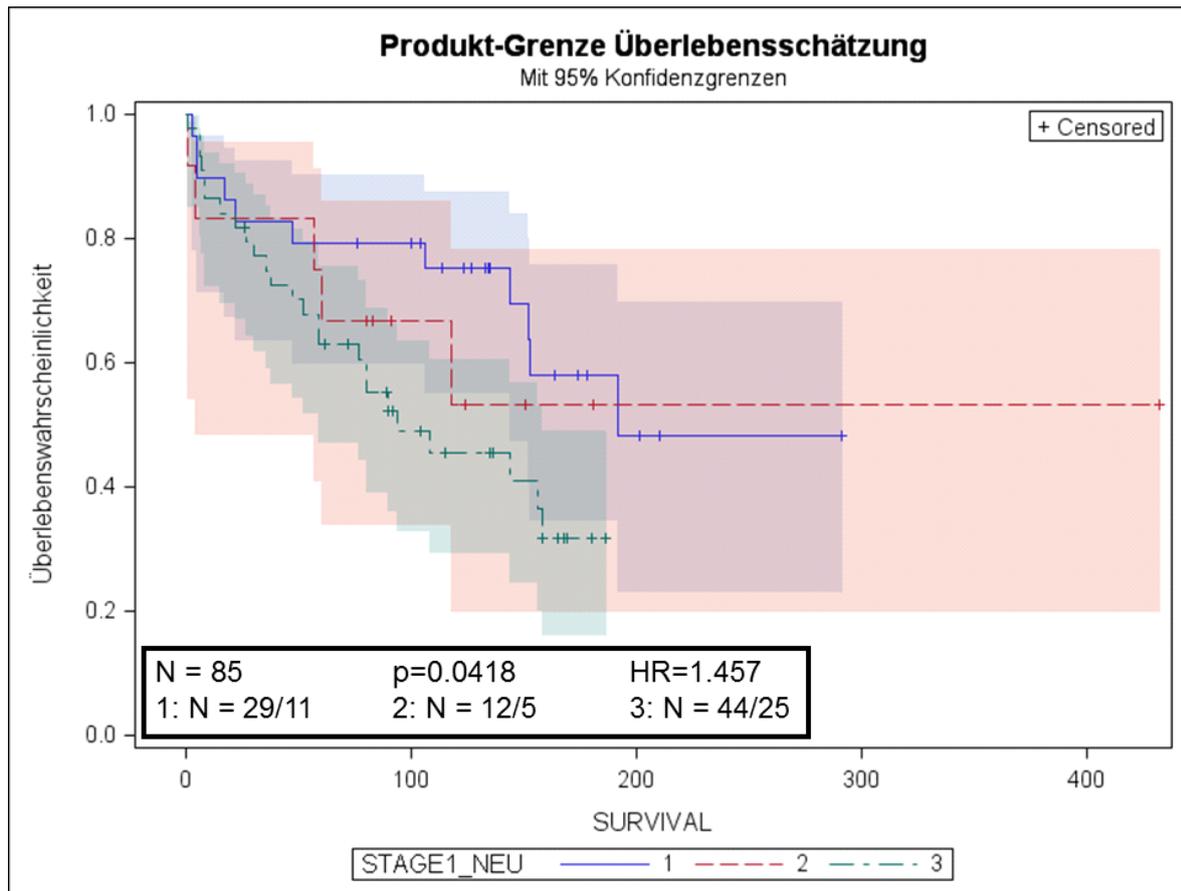
**Abb. 26: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Tumor-Staging (Kaplan-Meier-Kurve)**

1 (blaue Kurve): I, 2 (rote Kurve): IIa, 3 (grüne Kurve): IIb, IIIb und IV, 4 (braune Kurve) IIIa (s. Tab. 3)

Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.

HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

Es bestanden keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p=0,093$ ) zwischen den Gruppen bezüglich des Überlebens. Aufgrund der teilweise sehr geringen Besetzung der Subgruppen wurden Staging-Gruppen zusammengefasst (s. Abb. 27).



**Abb. 27: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Tumor-Staging (Kaplan-Meier-Kurve)**

1 (blaue Kurve): I bis IIa, 2 (rote Kurve): IIb bis IIIb, 3 (grüne Kurve): IV, 4 (s. Tab. 3)

Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.

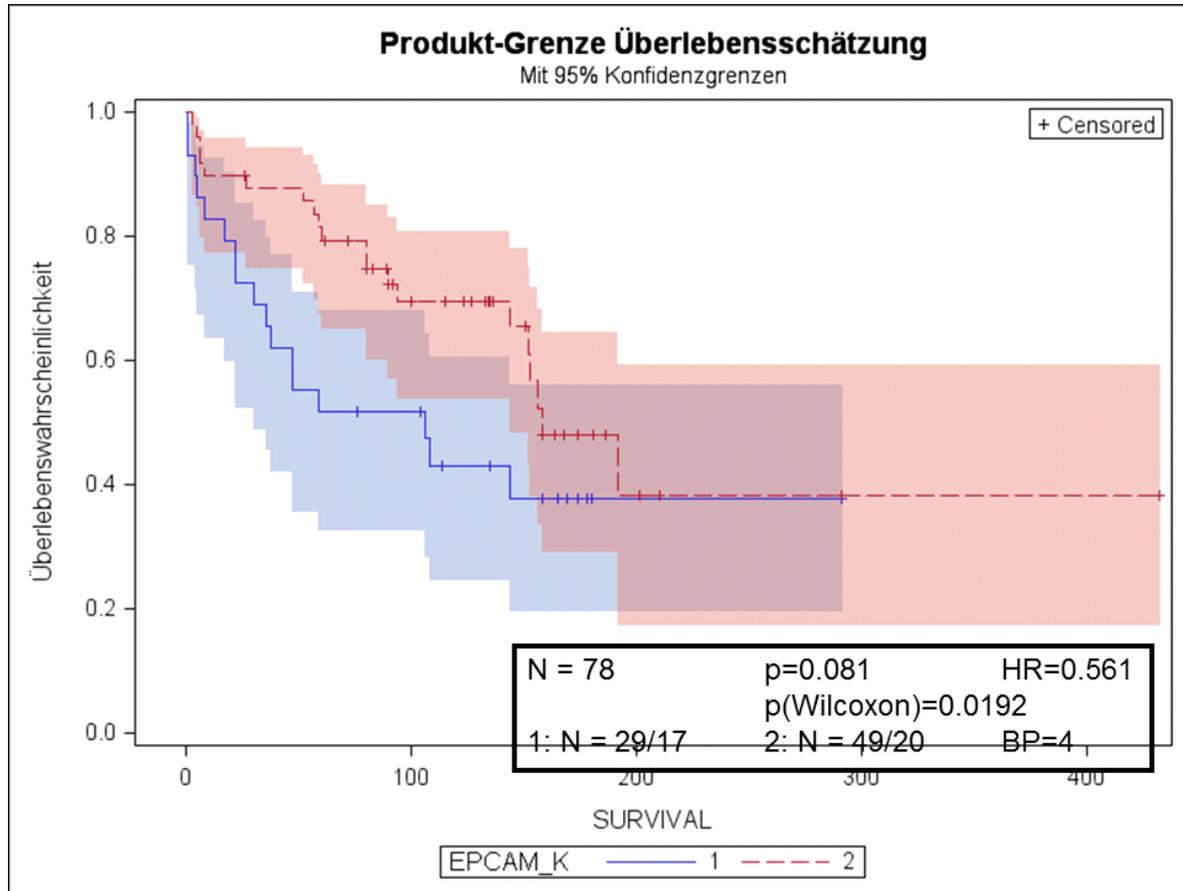
HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

Die Kaplan-Meier Kurve verdeutlicht, dass Patienten mit Tumor der Staging-Klasse IV ein tendenziell größeres Risiko besaßen, im Beobachtungszeitraum zu versterben als Patienten mit niedrigeren Staging-Klassen. Dieser Unterschied war mit einem  $p=0,0418$  signifikant.

- **Einfluss der EpCAM-Expression auf das Überleben**

Die Abbildungen 28 bis 32 vergleichen das Überleben von Patienten in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression des Tumors. Beim Vergleich von Patienten mit IRS-Score Werten  $\leq 4$  versus  $> 4$  verfehlten die Unterschiede bezüglich des Überlebens nur knapp die statistische Signifikanz ( $p=0,081$ , s. Abb. 28). Eine Verschiebung des Breakpoint-Wertes auf 6 bzw. 8 (IRS-Score) verschlechterte die prognostische Relevanz der EpCAM-Expression bezüglich des Überlebens (s. Abb. 29 und 31). Auch

die Einteilung der Patienten in drei Gruppen (IRS-Score 0–4, 6–8, 12) ergab keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit (s. Abb. 32).



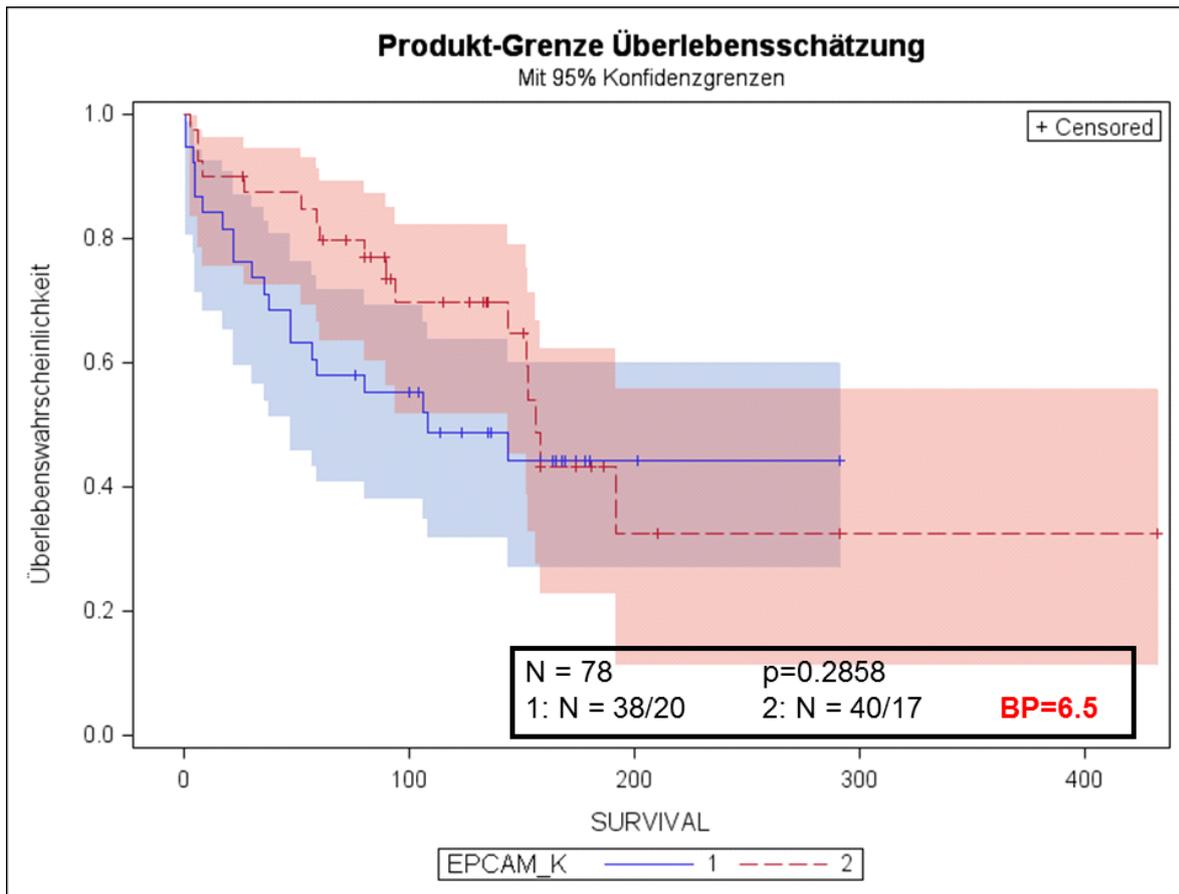
**Abb. 28: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression (Kaplan-Meier-Kurve) – Patienten mit IRS-Score Werten  $\leq 4$  versus  $> 4$**

1 (blaue Kurve): IRS-Score-Werte  $\leq 4$ , 2 (rote Kurve): IRS-Score-Werte  $> 4$

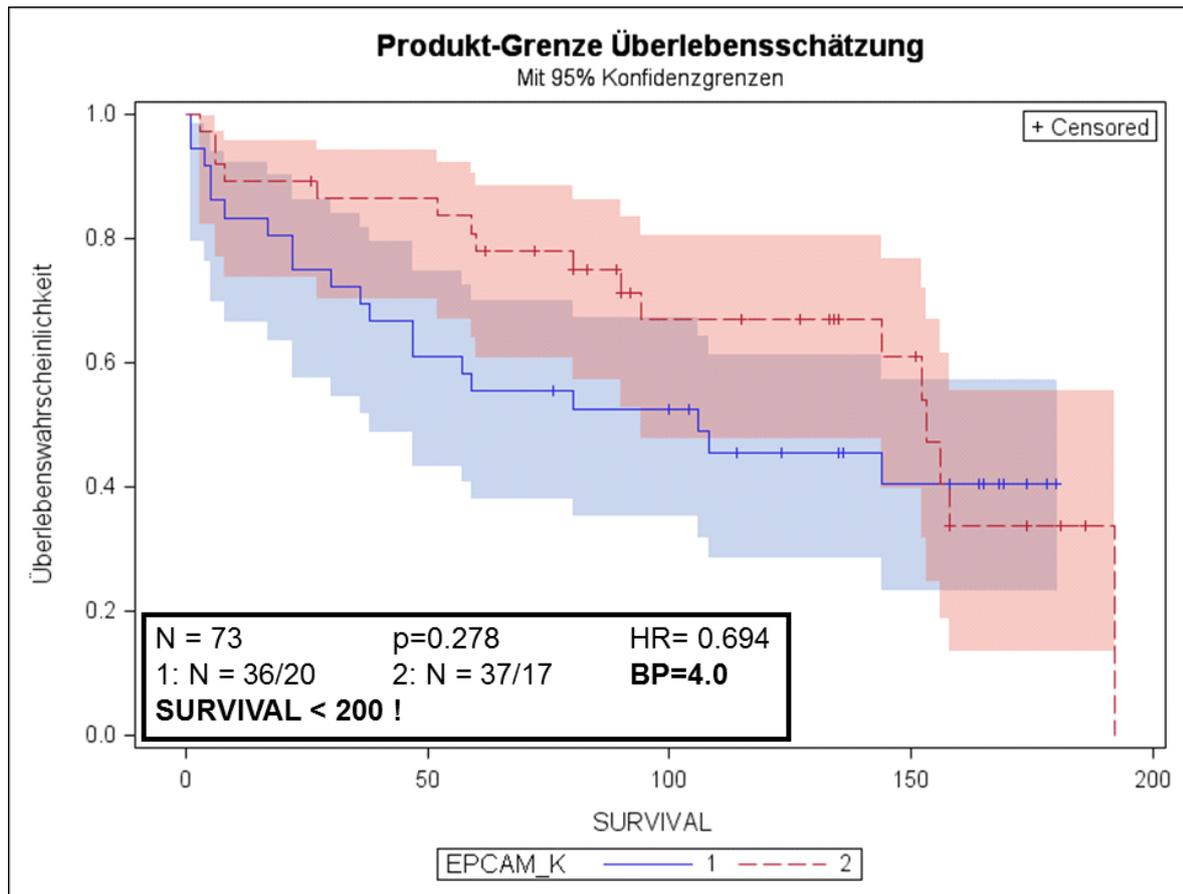
Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.

HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

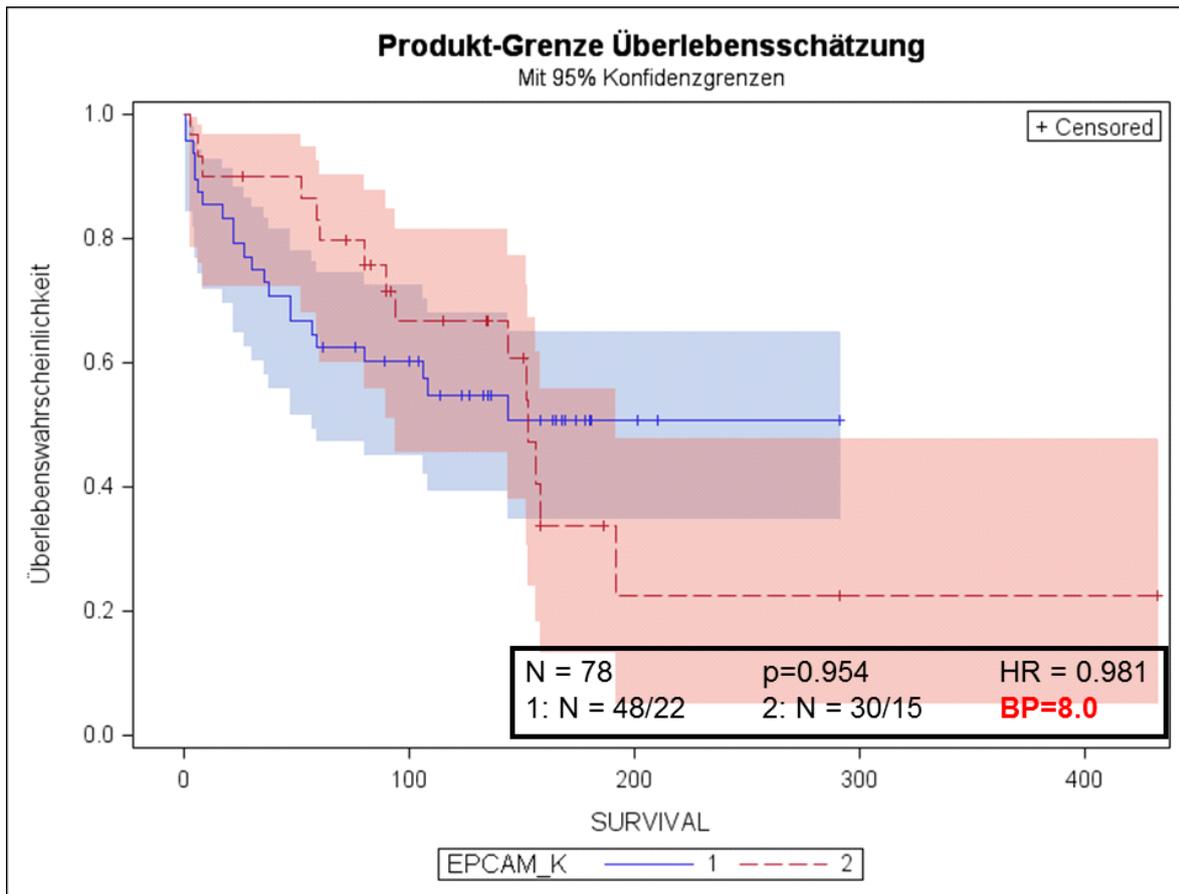
BP = Breakpoint IRS-Score (siehe Kap. 2.7)



**Abb. 29: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression (Kaplan-Meier-Kurve) – Patienten mit IRS-Score Werten  $\leq 6,5$  versus  $> 6,5$**   
 1 (blaue Kurve): IRS-Score-Werte  $\leq 6,5$ , 2 (rote Kurve): IRS-Score-Werte  $> 6,5$   
 Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.  
 HR = Hazard Ratio, N = Anzahl  
 BP = *Breakpoint* IRS-Score (siehe Kap. 2.7)



**Abb. 30: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression (Kaplan-Meier-Kurve) – Patienten mit IRS-Score Werten  $\leq 4$  versus  $> 4$**   
 1 (blaue Kurve): IRS-Score-Werte  $\leq 4$ , 2 (rote Kurve): IRS-Score-Werte  $> 4$   
 Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.  
 HR = Hazard Ratio, N = Anzahl  
 BP = *Breakpoint* IRS-Score (siehe Kap. 2.7)



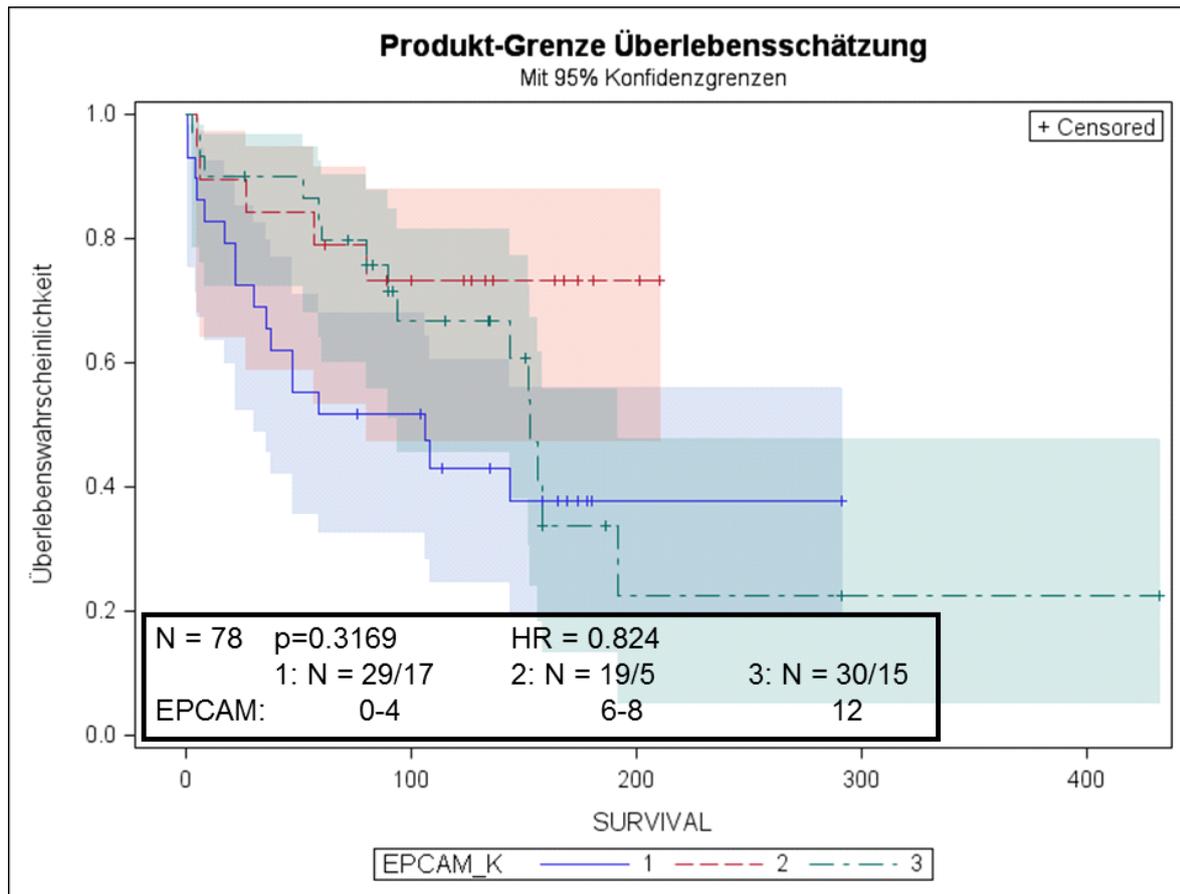
**Abb. 31: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression (Kaplan-Meier-Kurve) – Patienten mit IRS-Score Werten  $\leq 8$  versus  $> 8$**

1 (blaue Kurve): IRS-Score-Werte  $\leq 8$ , 2 (rote Kurve): IRS-Score-Werte  $> 8$

Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.

HR = Hazard Ratio, N = Anzahl

BP = *Breakpoint* IRS-Score (siehe Kap. 2.7)



**Abb. 32: Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression (Kaplan-Meier-Kurve) – Patienten mit IRS-Score Werten 0–4 versus 6–8 versus 12**  
 1 (blaue Kurve): IRS-Score-Werte 0–4, 2 (rote Kurve): IRS-Score-Werte 6–8, 3 (grüne Kurve) IRS-Score-Werte 12  
 Die farbigen Flächen markieren die 95 % Konfidenzgrenzen.  
 HR = Hazard Ratio, N = Anzahl  
 IRS-Score (siehe Kap. 2.7)

## • Diskussion

Zahlreiche Karzinome sind durch eine EpCAM-Überexpression charakterisiert. Laut Studien sind ca. 85 % der Adeno-Karzinome und 72 % der Plattenepithel-Karzinome (Kolon, Magen, Lungen, Niere, Mamma) davon betroffen [Went et al. 2004, 2005, 2006]. Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse der EpCAM-Expression in Gastrinomen, Pankreas- und anderen GEP-NEN, um die Eignung von EpCAM als potentiellen Prognosemarker für einen malignen Verlauf zu validieren.

- **Methodisches Vorgehen**

Die Analyse erfolgte mit Hilfe von TMAs, wodurch eine große Anzahl von Gewebeproben unter gleichen Bedingungen untersucht werden konnte, was die Vergleichbarkeit der Daten erhöht hat. Zudem konnten die immunhistochemischen Färbungen schnell, effizient und standardisiert durchgeführt werden [Yamashita et al. 2007]. Die mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms gefertigten Schnitte (Dicke 5 µm) wurden auf einen Objektträger aufgezogen. Die anschließende HE-Färbung diente der Identifikation und Markierung des Tumors (Folienstift) im Paraffinblock. Das ausgestanzte Tumorgewebe wurde dann auf den TMA positioniert.

Die immunhistochemische Untersuchung umfasste die EpCAM- und Ki-67-Expression. Ki-67 wird ausschließlich in proliferierenden Zellen exprimiert. In der Histochemie wird das Ki-67-Antigen als Proliferationsmarker verwendet, da es ausschließlich von sich teilenden Zellen exprimiert wird. Daher wird die Ki-67-Expression in der Tumordiagnostik als prognostischer Marker und in der Forschung zur Beurteilung der Zellproliferation verwendet [Gerdes et al. 1984a, Schwarting 1993]. Ki-67 bietet keine Möglichkeit für therapeutische Interventionen [Michalides et al. 2002].

Die Expression von EpCAM und Ki-67 wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Remmele-Score (auch Immunreaktiver Score, IRS) quantifiziert.

- **EpCAM-Expression in nicht-malignen und malignen Geweben**

Studien belegen einen Zusammenhang zwischen schnell proliferierenden Tumoren epithelialer Herkunft und einer deutlich erhöhten EpCAM-Expression. Aber auch nicht-maligne Epithelien produzieren in geringem Maße EpCAM [Balzar et al. 1999].

Die EpCAM-Expression beginnt im embryonalen Pankreas-Gewebe ab der 18. Entwicklungswoche [Cirulli et al. 1998]. Die höchste Expressionsrate wurde in den sich entwickelnden Inselzell-Clustern, die aus dem embryonalen duktalem Epithel hervorgehen, gemessen [Cirulli et al. 1998]. Es wird vermutet, dass der endokrine Anteil des Pankreas aus diesen Insel-Zellen hervorgeht. Im adulten Pankreas liegt jedoch ein spiegelverkehrtes Expressionsmuster vor: Die höchste EpCAM-Expression findet sich im Hauptgang, interlobulär und in den exokrinen kleinen Gängen des Pankreas. Die adulten Inselzellen weisen nur eine geringe EpCAM-Expression auf

[Cirulli et al. 1998]. Die Menge proliferierender fetaler Inselzellen korreliert mit der EpCAM-Expression im adulten exokrinen Pankreas. Nicht alle Zellen mit ausgeprägter EpCAM-Expression besitzen eine hohe Zellzyklusrate. Aus diesen Befunden leitet sich die Theorie ab, dass Zellen mit einer hohen EpCAM-Expression verstärkt auf proliferationsfördernde und mitogene Signale reagieren [Cirulli et al. 1998]. Unter der Prämisse, dass die EpCAM-Expression im exokrinen Anteil des adulten Pankreas am stärksten ist, lässt sich schlussfolgern, dass die exokrinen Gänge im adulten Pankreas im Vergleich zum endokrinen Anteil stärker auf Wachstumssignale reagieren. Diese Hypothese wird durch die Tatsache gestützt, dass sich ca. 90 % der Pankreas-Karzinome aus exokrinen Gangepithelien entwickeln [Saif 2011].

Bei der Proteolyse des membrangebundenen EpCAM-Proteins gelangt die intrazelluläre Domäne (EpIC) in den Zellkern und aktiviert als Bestandteil des Transkriptionskomplexes Transkriptionsfaktoren. Dadurch wird die Transkription des Protoonkogens c-myc und weiterer Gene induziert, die die Proliferation der Karzinomzellen steigern [Maetzel et al. 2009].

- **Zusammenhang zwischen der EpCAM-Expression und verschiedener Tumorparameter**

In der vorliegenden Studie wurde die EpCAM-Expression in Abhängigkeit verschiedener Tumorparameter (WHO-Klassifikation, Tumorstadium, Metastasierung) analysiert.

#### **WHO-Klassifikation**

Bei der Analyse der EpCAM-Expression in Abhängigkeit von der WHO-Klassifikation (s. Tab. 5) zeigten neuroendokrine Neoplasien Grad 2 die höchste EpCAM-Expression auf (s. Abb. 10). Die EpCAM-Expression in den Gruppen war aber nicht signifikant verschieden (ANOVA:  $F=1,641$ ,  $p=0,1987$ ). Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass mit Anstieg des Gradings eine Zunahme der EpCAM-Expression verbunden ist. Diese Aussage wird durch die Arbeiten von Khan et al. [2011], Fong et al. [2008] und Akita et al. [2011] unterstützt. Die Studien belegen eine häufige EpCAM-Überexpression in Pankreas-Karzinomen. In einer Studie zur EpCAM-Expression bei Pankreas-Karzinom-Patienten (N=153) zeigten 56 % der Patienten eine EpCAM-Überexpression (23 % ausgeprägt / 33 % mäßig) [Fong et al. 2008]. In einer weiteren Studie wiesen 49,5 % der Pankreas-Karzinom-Proben (N=95) eine ausgeprägte EpCAM-Expression

auf [Akita et al. 2011]. Die Analyse der EpCAM-Expression in malignen und gesunden Proben ergab eine deutlich höhere EpCAM-Expression in Karzinom-Proben [Balzar et al. 1999]. Bei der Interpretation der Literaturdaten ist zu bedenken, dass Tumoren charakteristischerweise ein inhomogenes Verteilungsbild verschiedener Antigene präsentieren. Die Aussagekraft von EpCAM-Daten basierend auf geringen Probenzahlen ist daher möglicherweise begrenzt. Zudem hängt der Anteil EpCAM-exprimierender Zellen von der Entnahmestelle aus dem Tumor und der Größe der Gewebeprobe ab [Akita et al. 2011, Balzar et al. 1999, Fong et al. 2008].

### **Tumorstadium**

In der vorliegenden Studie nahm die EpCAM-Expression mit zunehmendem Tumorstadium signifikant zu (s. Abb. 9, ANOVA:  $F=3,804$ ,  $p=0,0254$ ). Tumoren der Stadien IV (s. Tab. 3) wiesen die höchste Expression auf. Dieser Befund stimmt mit den Literaturdaten zum Pankreas-Karzinom überein [Akita et al. 2011, Fong et al. 2008]. Laut Kahn et al. [2013] korreliert die Höhe der EpCAM-Expression in verschiedenen Entitäten mit diversen pathologischen Parametern. Beispielsweise ist die EpCAM-Expression beim Gallenblasen-, Mamma- und Plattenepithel-Karzinom des Ösophagus mit einer malignen Progression assoziiert [Gastl et al. 2000, Spizzo et al. 2004, Stoecklein et al. 2006, Varga et al. 2004]. Beim Nierenzellkarzinom, beim Magenkarzinom und beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom geht eine erhöhte EpCAM-Expression dagegen mit einem verminderten malignen Potential einher [Schmidt et al. 2008, Seligson et al. 2004, Songun et al. 2005]. In der Studie von Kimura et al. 2007 korrelierte die EpCAM-Expression in Ösophagus-Karzinomen mit dem Tumorstadium ( $p=0,0037$ ).

In anderen Studien zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit hoher und niedriger Tumor-EpCAM-Expression in Bezug auf den histopathologischen Typ (schlecht / moderat / gut), die Größe des Tumors ( $pT1 / T2 / T3$ ) und Lymphknotenmetastasen [Akita et al. 2011, Kahn et al. 2013]. Damit scheint ein allgemeingültiger Zusammenhang zwischen der EpCAM-Expression und der Prognose der Erkrankung bzw. dem Tumorstadium zu fehlen.

### **Fernmetastasierung**

In der vorliegenden Studie zeigten Patienten mit Fernmetastasen im Vergleich zu Patienten ohne Fernmetastasen eine signifikant höhere EpCAM-Expression (s. Abb. 6:  $8,103 \pm 0,5756$  vs.  $5,048 \pm 1,092$ ,  $p=0,0102$ ). Laut Maetzel et al. [2009] ist eine hohe EpCAM-Expression mit der Bildung von Metastasen bzw. Fernmetastasen assoziiert. In der vorliegenden Studie zeigten Patienten mit ausschließlich regionalen Fernmetastasen im Vergleich zu Patienten mit Fernmetastasen unabhängig von der Lokalisation eine tendenziell, aber nicht signifikant geringere EpCAM-Expression ( $5,933 \pm 0,7610$  vs.  $7,600 \pm 0,5746$ ,  $p=0,078$ ). Die Lokalisation der Fernmetastasen scheint für die Höhe der EpCAM-Expression nicht relevant. Beim Vergleich der EpCAM-Expression von Patienten ohne Fernmetastasen bzw. mit Lungenmetastasierung (N=2) oder Peritonealkarzinose zeigten Patienten mit Lungenmetastasierung oder Peritonealkarzinose eine ähnliche, etwas erhöhte EpCAM-Expression im Vergleich zu Patienten ohne Fernmetastasen. Die Unterschiede in der EpCAM-Expression zwischen den drei Gruppen waren statistisch nicht signifikant ( $p=0,2408$ ). In den Studien von Akita et al. [2011] und Kahn et al. [2013] wird deutlich, dass das Vorhandensein von Fernmetastasen bei neuroendokrinen Tumoren und Pankreaskarzinomen mit einer erhöhten EpCAM-Expression einhergeht. In Kolon- und Mammakarzinomen von Mäusen wiesen große Metastasen eine vergleichbare EpCAM-Expression wie der Primarius auf, wohingegen kleine Metastasen EpCAM-negativ waren [Van der Gun et al. 2010].

### **LN-Metastasierung**

In der vorliegenden Studie zeigten Patienten mit LN-Metastasen im Vergleich zu Patienten ohne LN-Metastasen eine erhöhte EpCAM-Expression (s. Abb. 5,  $7,983 \pm 0,6095$  vs.  $6,667 \pm 1,599$ ). Der Unterschied von  $1,317 \pm 1,691$  war statistisch nicht signifikant ( $p=0,4389$ ). Bei dem Vergleich von Patienten ohne LN-Metastasen bzw. mit regionalen LN-Metastasen und peripheren LN-Metastasen wiesen Patienten mit regionalen LN-Metastasen die höchste EpCAM-Expression auf. Auch hier waren die Unterschiede aber statistisch nicht signifikant ( $p=0,5231$ ). Auch in der Literatur wird eine erhöhte EpCAM-Expression bei LN-positiven Karzinomen beschrieben [Akita et al. 2011, Kahn et al. 2013]. Die fehlende Signifikanz in der vorliegenden Studie beruht möglicherweise auf den teilweise sehr kleinen Untersuchungsgruppen (Patienten ohne LN-Metastasen: N=9, Patienten mit peripheren LN-Metastasen N=5).

- **Prognostische Bedeutung verschiedener Parameter für das Überleben**

In der vorliegenden Studie wurde weiter der Einfluss verschiedener Parameter auf das Überleben analysiert. In der univariaten Cox-Regressionsanalyse wurde der N-Status, die Ki-67-Expression und die WHO-Klassifikation als signifikante Einflussfaktoren für das Überleben identifiziert. Im Rahmen der multivariaten Analyse bestätigte sich das Ergebnis für den N-Status. Zusätzlich ließ sich die Tumorlokalisation (Darm vs. Pankreas vs. andere) als signifikanter Parameter für die Mortalität identifizieren. Im Folgenden werden die in den Kaplan-Meyer-Kurven analysierten potenziellen Prognosefaktoren für das Überleben diskutiert.

### **Geschlecht**

Weibliche Patienten zeigten im Vergleich zu männlichen Patienten (20 von 47) ein tendenziell größeres Risiko (HR=1,376) im Beobachtungszeitraum zu versterben (s. Abb. 12). Das Risiko war jedoch mit einem  $p=0,308$  nicht signifikant. Dieses Ergebnis spiegelt die Befunde in der Studie von Akita et al. [2011] wider.

### **Alter**

Weiter besaßen Patienten > 50 Jahre (im Vergleich zu den Patienten  $\leq 50$  Jahre ein tendenziell, jedoch nicht signifikant größeres Risiko im Beobachtungszeitraum zu versterben ( $p=0,175$ ). Auch bei einer Festlegung des Breakpoints auf 57,5 Jahre waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant (s. Abb. 13,  $p=0,151$ ). In der Studie von Akita et al. (2011) wurde ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit hoher und niedriger Tumor-Ep-CAM-Expression in Bezug auf das Alter festgestellt.

### **Staging**

Auch das Staging des Tumors zeigte keinen signifikanten Effekt auf das Überleben (s. Abb. 27,  $p=0,093$ ). Aufgrund der teilweise sehr geringen Besetzung der Subgruppen wurden Staging-Gruppen zusammengefasst (s. Abb. 28). In dieser Analyse hatten Patienten mit Tumoren der Staging-Klasse IV ein signifikant größeres Risiko, im

Beobachtungszeitraum zu versterben, als Patienten mit niedrigeren Staging-Klassen. ( $p=0,0418$ ). Bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreas-Karzinom korrelierte eine EpCAM-Überexpression mit einem kürzeren Gesamtüberleben [Fong et al. 2008]. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte berücksichtigt werden, dass von insgesamt 153 Patienten 62 Patienten palliativ operiert und 29 Patienten als inoperabel eingestuft wurden. Weiter wurden entscheidende Prognosefaktoren für Pankreas-Karzinome (z. B. LN-Metastasen) nicht berücksichtigt und Resektionsränder der Präparate nicht erfasst [Fong et al. 2008]. Durch diese methodischen Mängel ist die Aussagekraft der Befunde, um einen direkten Zusammenhang zwischen einer ungünstigen Prognose und einer hohen EpCAM-Expression zu ermitteln, eingeschränkt [Schmidt et al. 2008].

### **Tumorgroße**

Patienten mit Tumoren  $> 1,5$  cm besaßen in der vorliegenden Studie im Vergleich zu Patienten mit Tumoren  $\leq 1,5$  cm ein etwa doppelt so großes Risiko im Beobachtungszeitraum zu versterben ( $HR=2,132$ ). Dieser Unterschied zwischen den Gruppen war jedoch mit einem  $p = 0,151$  nicht signifikant. Dieser Befund wird durch die Ergebnisse der Studie von Saif et al. [2011] gestützt.

### **TNM-Klassifikation**

Der Einfluss der Parameter der TNM-Klassifikation (s. Tab. 2) auf das Überleben wird in den Abbildung 21–23 dargestellt. Patienten mit einem T1- oder T2-Stadium schienen ein deutlich geringeres Risiko zu besitzen, im Beobachtungszeitraum zu versterben, als Patienten mit einem T3- oder T4-Stadium. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren jedoch knapp nicht signifikant ( $0,057$ , s. Abb. 21). Auch hier ist die geringe Belegung der Gruppen ( $N=16–34$ ) eine mögliche Ursache für die fehlende Signifikanz. Weiter nahm mit steigendem N-Stadium ( $p=0,043$ ; s. Abb. 22) und M-Stadium ( $p=0,063$ ; s. Abb. 23) das Risiko zu, im Beobachtungszeitraum zu versterben. Dieser Effekt erreichte aber nur für das N-Stadium statistische Signifikanz.

### **LN-Metastasierung**

Patienten mit peripheren und regionalen LN-Metastasen wiesen ein tendenziell größeres Risiko auf, im Beobachtungszeitraum zu versterben, als Patienten ohne

Lymphknotenmetastasen, von den keiner im Beobachtungszeitraum verstarb (s. Abb. 18). Das Mortalitätsrisiko war jedoch mit einem  $p = 0,111$  zwischen den Gruppen nicht signifikant. Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden von Akita et al. [2011] bei Pankreas-Karzinomen und von Kahn et al. [2013] bei Pankreas-NEN überein.

## **Fernmetastasierung**

Laut Kaplan-Meier Kurve schienen die Patienten mit regionalen Fernmetastasen im Vergleich zu Patienten ohne Fernmetastasen und Patienten mit regionalen Fernmetastasen das größte Mortalitätsrisiko zu besitzen (s. Abb. 19). Das Risiko war jedoch mit einem  $HR=1,035$  vergleichbar und nicht signifikant verschieden ( $p=0,809$ ). Laut einer Theorie besitzen Tumor-Stammzellen die gleichen Eigenschaften wie originäre Stammzellen. Dazu zählen Tumorgenität, Pluripotenz, hohe Widerstandsfähigkeit gegenüber Noxen und ein erhöhtes Regenerationspotential. Somit könnten Tumor-Stammzellen die Keimzellen für Tumoren darstellen [Lapidot et al. 1994]. 2007 wurde die Existenz von Tumor-Stammzellen in Pankreas-Adenokarzinomen nachgewiesen. In dieser Entität triggern Tumor-Stammzellen die Metastasierung und Invasivität [Rosen & Jordan 2009]. Weitere Studien identifizieren EpCAM als Oberflächenmarker für Tumor-Stammzellen und zeigten eine erhöhte EpCAM-Expression in diesen Zellen [Cioffi & Heeschen 2012, Hermann et al. 2007]. Tumor-Stammzellen EpCAM-exprimierender Pankreas-Karzinome wiesen im Vergleich zu EpCAM-negativen Zellen ein um den Faktor 100 verstärktes karzinogenes Potential auf [Hermann et al. 2007]. Bei Severe Combined Immunodeficiency-(SCID)-Mäusen leiteten EpCAM-positive Tumorstamm-Zellen im Gegensatz zu EpCAM-negativen Tumorstammzellen die hepatozelluläre Karzinombildung ein bzw. begünstigten diese [Munz et al. 2009]. Unter den Tumor-Stammzellen ließen sich EpCAM-negative Zellen mit einem mesenchymalen Phänotyp nachweisen. Theoretisch ist es möglich, dass epitheliale Tumorzellen im Verlauf der Karzinogenese phänotypische Veränderungen durchlaufen, um zu metastasieren [Li et al. 2007, Mani et al. 2008, Yamashita et al. 2009]. Mit der Veränderung des Phänotyps geht der Verlust der Zell-Polarität und eine verringerte interzelluläre Adhäsion einher [Mani et al. 2008]. Dadurch nehmen die epithelialen Zellen eine Fibroblasten-ähnliche Struktur an. Durch die Migration und Invasion geht die Struktur im Gewebe verloren [Yamashita et al. 2009]. Des Weiteren exprimieren die Zellen

mesenchymale Proteine (z. B. N-Cadherin, Vimentin) und verlieren gleichzeitig epitheliale Marker [Mani et al. 2008, Thiery et al. 2009]. Die Umwandlung von Epithelzellen zu Zellen mesenchymalen Phänotyps wird als Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet. Dieser Vorgang ist mit der Verringerung bzw. dem kompletten Rückgang der EpCAM-Expression, sowie seiner erneuten Expression in Metastasen verbunden [Gorges et al. 2012, Palagani et al. 2012, Trzpis et al. 2007]. Entscheidend bei der EMT ist der Verlust der E-Cadherin-Expression [Yamashita et al. 2009]. Die Expression von EpCAM und E-Cadherin ist beim Pankreas-Karzinom eng miteinander verknüpft. EpCAM-transfizierte Zelllinien zeigten eine erhöhte Expression von E-Cadherin und Vimentin [Akita et al. 2011].

### **WHO-Stadium**

In der vorliegenden Kaplan-Maier-Analyse nahm mit steigendem WHO-Stadium das Mortalitätsrisiko der Patienten signifikant zu ( $p=0,033$ , s. Abb. 26). Die Unterschiede waren mit einem  $p=0,033$  signifikant. Dieses Ergebnis stimmt mit den Daten der Studien von Akita et al. [2011] und Kahn et al. [2013] überein.

### **Ki-67-Expression**

Bei der Analyse des Einflusses der Ki-67-Expression auf das Überleben wurden verschiedene Gruppen in Abhängigkeit von der Höhe der Expression gebildet (Breakpoint IRS-Score 3 bzw. 2, s. Abb. 24 und 25). Patienten mit einer Ki-67-Expression  $\leq 3$  zeigten ein signifikant besseres Überleben als Patienten mit einer Ki-67-Expression  $>3$  ( $p=0,0297$ ). In der Gruppe mit der höheren Ki-67-Expression lag das Risiko fast doppelt so hoch ( $HR=1,984$ ). Bei einer Aufteilung der Patienten in Gruppen mit einer Ki-67-Expression  $\leq 2$  und  $> 2$  näherten sich die Kurven an (s. Abb. 25). Der Unterschied bezüglich des Mortalitätsrisikos war nicht mehr signifikant ( $p=0,5779$ ). Diese Aussage wird durch die Studien von Lebe et al. [2004] und Stanton et al. [2003] untermauert.

### **Tumorlokalisation**

Den Einfluss der Tumorlokalisation auf das Überleben ist aus Abbildung 15 zu entnehmen. Hier wird das Überleben der Patienten im Beobachtungszeitraum in Abhängigkeit von der Lokalisation (foregut, midgut, hindgut) der Tumoren dargestellt.

In der vorliegenden Studie besaßen Patienten mit foregut-Tumoren ein tendenziell größeres Mortalitätsrisiko als Patienten mit midgut- oder hindgut-Tumoren ( $p=0,193$ , s. Abb. 15). Beim Vergleich des Überlebens der Patienten mit Pankreas-, Darm- und Tumoren scheinen Patienten mit Tumoren in anderen Lokalisationen ein tendenziell größeres Mortalitätsrisiko zu besitzen [Akita et al. 2011, Gorges et al. 2012].

### **EpCAM-Expression**

Bei der Analyse zum Einfluss der EpCAM-Expression auf das Überleben wurden verschiedene Gruppen verglichen (s. Abb. 29–33). Bei dem Vergleich von Patienten mit IRS-Score-Werten  $\leq 4$  versus  $> 4$  verfehlten die Unterschiede bezüglich des Überlebens nur knapp die statistische Signifikanz ( $p=0,081$ ). Bei der Verwendung des Wilcoxon-Tests wurde der Unterschied dagegen mit einer  $p=0,0192$  als signifikant eingestuft (s. Abb. 28). Patienten mit Werten  $> 4$  zeigten ein fast doppelt so geringes Risiko zu versterben ( $HR=0,561$ ). Eine Verschiebung des Breakpoint-Wertes auf 6 bzw. 8 (IRS-Score) verschlechterte die prognostische Relevanz der EpCAM-Expression bezüglich des Überlebens (s. Abb. 29 und 31). Auch bei der Einteilung der Patienten in drei Gruppen (IRS-Score 0–4, 6–8, 12) wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Überlebenswahrscheinlichkeit festgestellt (s. Abb. 32).

In der Studie von Akita et al. [2011] zeigten Pankreas-Karzinom-Patienten mit hoher EpCAM-Expression im Vergleich zu Patienten mit niedriger oder fehlender EpCAM-Expression eine signifikant bessere Prognose (3-Jahres Überlebensrate 56,2 % vs. 19,2 %,  $p=0,0018$ ). In einer in vitro Untersuchung wurde das maligne Potential von EpCAM-transfizierten Zelllinien des Pankreas-Karzinoms und von nativen Elternzellen mit Hilfe von Migrations-Proliferations- und Invasion-Assays erfasst. Eine der drei EpCAM-transfizierten Zelllinien zeigte eine signifikant geringere Proliferation im Vergleich zu den Elternzellen [Stoecklein et al. 2006]. Zudem war das maligne Potential der EpCAM-transfizierten Zelllinien im Vergleich zu den Elternzellen signifikant geringer [Akita et al. 2011]. In der in folgenden genannten Studie korrelierte die EpCAM-Expression in Ösophagus-Karzinomen mit dem Tumorstadium ( $p=0,0037$ ), der Gefäßinfiltration ( $p=0,0397$ ) und der Tumortiefe ( $p=0,0005$ ). Patienten mit hoher EpCAM-Expression im Gewebe zeigten eine signifikant höhere Überlebensrate ( $p=0,0291$ ) [Kimura et al. 2007]. Eine weitere Studie fand bei Ösophagus-Karzinomen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der EpCAM-

Expression und klinisch-pathologischen Prognosefaktoren. Jedoch korrelierte eine EpCAM-Überexpression mit einer reduzierten medianen Gesamtüberlebenszeit ( $p=0,0003$ ) und einer reduzierten medianen krankheitsfreien Periode ( $p=0,0001$ ) [Stoecklein et al. 2006].

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung / Doktorarbeit konnten lediglich der LN-Status ( $p=0,0226$ ) und die Lokalisation des Primarius (Darm vs. Pankreas vs. andere,  $p=0,0138$ ) als signifikante Risikofaktoren für das Versterben identifiziert werden. Wiederum erwies sich die EpCAM-Expression nicht als signifikanter Prognosefaktor ( $p=0,123$ ). Alle in das Modell einbezogenen Faktoren, bis auf eine EpCAM-Expression  $>4$  erhöhten das Risiko zu versterben. Den stärksten Effekt zeigt mit einer HR=2,759 eine Tumorgroße  $>1,5$  cm. Wie schon in der univariaten Analyse erwies sich die EpCAM-Expression als protektiv (HR=0,586)

- **Bedeutung von EpCAM in der malignen Zelle**

EpCAM hebt die Bindung zwischen  $\beta$ -Catenin und F-Aktin auf und ist somit die E-Cadherin vermittelte Zell-Zell-Adhäsion [Seligson et al. 2004] auf. Außerdem fördert EpCAM vermutlich über eine Bindung an Claudin, die Proliferation, Zellmotilität, Karzinogenese und die Bildung von Metastasen [Maetzel et al. 2009]. Des Weiteren begünstigt EpCAM über eine verminderte Abhängigkeit der Zellen von Wachstumsfaktoren die Dedifferenzierung und Proliferation. Daran beteiligt ist die intrazelluläre Domäne EpIC, die als Bestandteil eines Transkriptionskomplexes die Expression von c-myc und Cyclin-A/E induziert [Maetzel et al. 2009]. Dieser Mechanismus erklärt auch die schlechte Prognose einiger Karzinome bei erhöhter EpCAM-Expression und die onkogenen Eigenschaften von EpCAM [Gastl et al. 2000, Spizzo et al. 2004, Stoecklein et al. 2006, Varga et al. 2004].

Andere Studien belegen, dass EpCAM als Zelladhäsions-Molekül die Zellstreuung im Gewebe und invasive Prozesse durch homophile Zell-Zell-Adhäsionen inhibiert [Geer & Brennan 1993]. So ist die EpCAM-Expression in Metastasen des Nierenzellkarzinoms geringer als im Primärtumor [Litvinov et al. 1996]. Laut einer Studie aus dem Jahr 2007 erhöht sich bei kolorektalen Karzinomen durch den Verlust der EpCAM-Expression das Migrationspotential [Winter et al. 2003a].

Andere Untersuchungen fanden, dass eine hohe EpCAM-Expression bei einigen Tumoren mit einer besseren Prognose einhergeht [Schmidt et al. 2008, Seligson et al. 2004, Songun et al. 2005]. Somit hätte EpCAM eine tumorsuppressive Wirkung.

Eine erhöhte EpCAM-Expression korreliert in einigen Studien mit einer erhöhten Proliferationsrate und mit einer reduzierten Zell-Differenzierung [Gosens et al. 2007, Litvinov et al. 1994b, 1996]. Plattenepithelien exprimieren im gesunden Zustand kein EpCAM. Beim Plattenepithel der Zervix uteri kommt es dagegen schon in einem frühen Stadium zu einer EpCAM-Expression im Gewebe mit dedifferenzierten oder atypischen Zellen [Litvinov et al. 1994b]. Im Stadium CIN I und II exprimieren lediglich die basalen und suprabasalen Zellen EpCAM und im Stadium III fast alle Zellen [Litvinov et al. 1994b]. Weiter korreliert die Zellproliferation und der Rückgang der Differenzierungsmerkmale mit der Höhe der EpCAM-Expression [Litvinov et al. 1994b].

Verschiedene Studien belegen, dass sich die EpCAM-Expression in den Drüsen des Gastrointestinaltrakts von den Krypten zu den Villi verringert und dass ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Proliferation der intestinalen Zellen und der EpCAM-Expression besteht [High et al. 1996, Litvinov et al. 1996]. Beim Krankheitsbild der akuten myeloischen Leukämie wurde im Jahr 1994 erstmals die Existenz von Tumor-Stammzellen diskutiert [Schiechl et al. 1986]. Im Mausmodell lösen reimplantierte Tumor-Stammzellen das Wachstum eines Primärtumors aus [Schiechl et al. 1986]. Die dabei auftretende ausgeprägte EpCAM-Expression korreliert mit der Ausbildung von metaplastischem und dysplastischem Gewebe [Litvinov et al. 1996]. Daraus lässt sich schließen, dass die EpCAM-Expression im Rahmen der Karzinogenese mit der Dedifferenzierung und der malignen Proliferation in Zusammenhang steht.

Theoretisch wäre es möglich, dass beim Pankreas-Karzinom die EpCAM-Expression zu Beginn der malignen Erkrankung ansteigt und im Verlauf der EMT wieder rückläufig wird.

Die biologische Rolle von EpCAM in Karzinomen und damit die Grundfrage, ob es sich um ein tumor-spezifisches Antigen oder ein epitheliales Differenzierungs-Antigen handelt, kann nur durch weitere Analysen beantwortet werden.

- **Schlussfolgerung und Ausblick**

Die vorliegenden Ergebnisse unterstreichen die bisherigen Befunde in der Literatur, dass die klinische Bedeutung der EpCAM-Expression individuell für die Tumor- bzw. Karzinomgruppe zu beurteilen ist. In einigen Entitäten erweist sich die EpCAM-Expression als guter Prognosefaktor (Nierenzellkarzinome [Seligson et al. 2004], Magenkrebs [Songun et al. 2005] und Speiseröhrenkrebs [Kimura et al. 2007]). Bei anderen Entitäten besitzt die EpCAM-Expression dagegen kein bzw. ein eingeschränktes prognostisches Potential (Brustkrebs [Gastl et al. 2000; Schmidt et al. 2008], Gallenblasenkrebs [Varga et al. 2004] und Speiseröhrenkrebs [Stoecklein et al. 2006]). Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden lediglich der LN-Status ( $p=0,0226$ ) und die Lokalisation des Primarius (Darm vs. Pankreas vs. andere,  $p=0,0138$ ) als signifikante Vorhersagefaktoren für die Mortalität identifiziert. Das Ausmaß der EpCAM-Expression war jedoch nicht mit der Mortalität assoziiert ( $p=0,123$ ). Alle in das multivariate Cox-Regressionsmodell einbezogenen Faktoren, bis auf eine EpCAM-Expression  $>4$  erhöhten das Risiko zu versterben. Den stärksten Effekt zeigte mit einer  $HR=2,759$  eine Tumorgroße  $>1,5$  cm. Wie schon in der univariaten Analyse erwies sich die EpCAM-Expression als protektiv ( $HR=0,586$ ). Deutlich wird ein signifikanter Unterschied zwischen der EpCAM-Expression und Patienten mit positiven Lymphknoten und Fernmetastasen. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine starke EpCAM-Expression Patienten mit einem niedrigen Risiko für einen malignen Verlauf möglicherweise identifizieren und somit ggf. als Prognosemarker dienen kann.

- 

- **Literaturverzeichnis**

Abe H, Kuroki M, Imakiire T, Yamauchi Y, Yamada H, Arakawa F, Kuroki M (2002) Preparation of recombinant MK-1/Ep-CAM and establishment of an ELISA system for determining soluble MK-1/Ep-CAM levels in sera of cancer patients. J Immunol Methods 270:227-33.

Akita H, Nagano H, Takeda Y, Eguchi H, Wada H, Kobayashi S, Marubashi S, Tanemura M, Takahashi H, Ohigashi H, Tomita Y, Ishikawa O, Mori M, Doki Y (2011) Ep-CAM is a significant prognostic factor in pancreatic cancer patients by suppressing cell activity. Oncogene 30:3468-76.

- Anlauf M, Garbrecht N, Henopp T, Schmitt A, Schlenger R, Raffel A, Krausch M, Gimm O, Eisenberger CF, Knoefel WT, Dralle H, Komminoth P, Heitz U, Perren A, Klöppel G (2006) Sporadic versus hereditary gastrinomas of the duodenum and pancreas: distinct clinico-pathological and epidemiological features. *World J Gastroenterol* 12:5440-6.
- Anlauf M, Bauersfeld J, Raffel A, Koch CA, Henopp T, Alkatout I, Schmitt A, Weber A, Kruse ML, Braunstein S, Kaserer K, Brauckhoff M, Dralle H, Moch H, Heitz PU, Komminoth P, Knoefel WT, Perren A, Klöppel G (2009) Insulinomatosis: a multicentric insulinoma disease that frequently causes early recurrent hyperinsulinemic hypoglycemia. *Am J Surg Pathol* 33:339-46.
- Anlauf M, Gerlach P, Schott M, Raffel A, Krausch M, Knoefel WT, Pavel M, Klöppel G (2011) Pathology of neuroendocrine neoplasms. *Chirurg* 82:567-73.
- Aparicio T, Ducreux M, Baudin E, Sabourin JC, De Baere T, Mitry E, Schlumberger M, Rougier P (2001) Antitumour activity of somatostatin analogues in progressive metastatic neuroendocrine tumours. *Eur J Cancer* 37:1014-19.
- Armstrong A, Eck SL (2003) EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol Ther* 2:320-6.
- Arnold R, Frank M (1996) Control of growth in neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors. *Digestion* 57 Suppl 1:69-71.
- Arnold R, Trautmann ME, Creutzfeldt W, Benning R, Benning M, Neuhaus C, Jurgensen R, Stein K, Schafer H, Bruns C, Dennler HJ (1996) Somatostatin analogue octreotide and inhibition of tumour growth in metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumours. *Gut* 38:430-38.
- Arnold R, Simon B, Wied M (2000) Treatment of neuroendocrine GEP tumours with somatostatin analogues. *Digestion* 62 Suppl 1:84-91.
- Arnold B, Badihian T, Krusche S, Brabant G (2004) Neuroendokrine Tumoren. *Der Onkologe* 10:560-9.
- Arnold R (2005) Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Introduction: definition, historical aspects, classification, staging, prognosis and therapeutic options. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 19:491-505.

- Baeuerle PA, Gires O (2007) EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer* 96:417-23.
- Bajetta E, Ferrari L, Martinetti A, Celio, Procopio G, Artale S, Zilembo N, Di Bartolomeo M, Seregni E, Bombardieri E (1999) Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patients with neuroendocrine tumors. *Cancer* 86:858-65.
- Bale AE, Norton JA, Wong EL, Fryburg JS, Maton PN, Oldfield EH, Streeten E, Aurbach GD, Brandi ML, Friedman E (1991) Allelic loss on chromosome 11 in hereditary and sporadic tumors related to familial multiple endocrine neoplasia type 1. *Cancer Res* 51:1154-7.
- Balzar M, Winter MJ, De Boer CJ, Litvinov SV (1999) The biology of the 17-1A antigen (EpCAM). *J Mol Med (Berl)* 77:699-712.
- Bassett JHD, Forbes SH, Pannett AA, Lloyd SE, Christie PT, Wooding C, Harding B, Besser GM, Edwards CR, Monson JP, Sampson J, Wass JA, Wheeler MH, Thakker RV (1998) Characterization of mutations in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Am J Hum Genet* 6:232-44.
- Begum N, Maasberg S, Plöckinger U, Anlauf M, Rinke A, Pöpperl G, Lehnert H, Izbicki JR, Krausch M, Vashist YK, Raffel A, Bürk CG, Hoffmann J, Goretzki P, Pape UF (2014) [Neuroendocrine](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23042103) [HYPERLINK](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23042103) ["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23042103"tumours](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23042103) [HYPERLINK](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23042103) ["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23042103" of the GI tract--data from the German NET Registry.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23042103) *Zentralbl Chir* 139:276-83.
- Bhattacharyya S, Toumpanakis C, Caplin ME, Davar J (2008) Analysis of 150 patients with carcinoid syndrome seen in a single year at one institution in the first decade of the twenty- first century. *Am J Cardiol* 101:378-81.
- Blankenship C, Naglich JG, Whaley JM, Seizinger B, Kley N (1999) Alternate choice of initiation codon produces a biologically active product of the von Hippel Lindau gene with tumor suppressor activity. *Oncogene* 18:1529-35.
- Böcker W, Denk H, Heitz PU (2004) *Pathologie*. München: Elsevier / Urban & Fischer Verlag, 425-32, 433-8.
- Bosman F, Carneiro F, Hruban RM, Theise ND (2010) WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Genf: World Health organization, 20.

- Braun S, Hepp F, Kentenich CR, Janni W, Pantel K, Riethmuller G, Willgeroth F, Sommer HL (1999) Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res* 5:3999-4004.
- Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G (2001) Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol* 195:72-9.
- Campana D, Nori F, Piscitelli L, Morselli-Labate AM, Pezzilli R, Corinaldesi R, Tomassetti P (2007) Chromogranin A: is it a useful marker of neuroendocrine tumors? *J Clin Oncol* 25:1967-73.
- Capella C, Heitz PU, Hofler H, Solcia E, Klöppel G (1994) Revised classification of neuroendocrine tumors of the lung, pancreas and gut. *Digestion* 55 Suppl 3:11-23.
- Capella C, Solcia E, Sobin LH, Arnold R (2000) Endocrine tumours of the stomach. In: Hamilton SR, Aaltonen LA: *WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. Lyon: IARC Press, 137-9.
- Cassidy MA (1930) Abdominal carcinomatosis with probable adrenal involvement. *Proc R Soc Med* 24:138-41.
- Cawthon RM, Weiss R, Xu GF, Viskochil D, Culver M, Stevens J, Robertson M, Dunn D, Gesteland R, O'Connell P, White R (1990) A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell* 13:193-201.
- Chong JM, Speicher DW (2001) Determination of disulfide bond assignments and Nglycosylation sites of the human gastrointestinal carcinoma antigen GA733-2 (CO17-1A, EGP, KS1-4, KSA, and Ep-CAM). *J Biol Chem* 276:5804-13.
- Ciaccio C (1906) Sur une nouvelle espèce cellulaire dans les glandes de Lieberkühn. *CR Soc Biol* 1:76-8.
- Cioffi M, Heeschen C (2012) Immuno-targeting of pancreatic cancer stem cells: A new therapeutic strategy against a devastating disease? *Oncoimmunology* 1:560-2.
- Cirulli V, Ricordi C, Hayek A (1995) E-cadherin, NCAM, and EpCAM expression in human fetal pancreata. *Transplant Proc* 27:3335.

- Cirulli V, Crisa L, Beattie GM, Mally MI, Lopez AD, Fannon A, Ptasznik A, Inverardi L, Ricordi C, Deerinck T, Ellisman M, Reisfeld RA, Hayek A (1998) KSA antigen Ep-CAM mediates cell-cell adhesion of pancreatic epithelial cells: morphoregulatory roles in pancreatic islet development. *J Cell Biol* 140:1519-34.
- Clarke MR, Baker EE, Weyant RJ, Hill L, Carty SE (1997) Proliferative activity in pancreatic endocrine tumors: association with function, metastases, and survival. *Endocr Pathol* 8:181-7.
- Corless CL, Kibel AS, Iliopoulos O, Kaelin WG Jr (1997) Immunostaining of the von Hippel-Lindau gene product in normal and neoplastic human tissues. *Hum Pathol* 28:459-64.
- DeLellis R, Heitz PU, Lloyd R, Eng C (2004) *Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon: IARC Press.
- Dörffel Y, Wermke W (2009) Contrast medium sonography of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. *Radiologe* 49:206-16.
- Endl E, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Exp Cell Res* 257:231-7.
- Eriksson B, Oberg K, Stridsberg M (2000) Tumor markers in neuroendocrine tumors. *Digestion* 62 Suppl 1:33-8.
- Erspamer V, Asero B (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature* 169:800-1.
- Ezziddin S, Logvinski T, Yong-Hing C, Ahmadzadehfar H, Fischer HP, Palmedo H, Bucerius J, Reinhardt MJ, Biersack HJ (2006) Factors predicting tracer uptake in somatostatin receptor and MIBG scintigraphy of metastatic gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *J Nucl Med* 47:223-33.
- Faiss S, Wiedenmann B, Zimmer T (1997) Diagnostik und Therapie neuroendokriner Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems. *Klinik der Gegenwart* 10:1-18.
- Faiss S, Räth U, Mansmann U, Caird D, Clemens N, Riecken EO, Wiedenmann B (1999) Ultra-highdose lanreotide treatment in patients with metastatic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors. *Digestion* 60:469-76.
- Faiss S, Pape U, B ohmig M, Dörffel Y, Mansmann U, Golder W, Riecken EO, Wiedenmann B (2003) Prospective, randomized multicenter trial on the

antiproliferative effect of lanreotide, interferon-alpha and the combination for therapy of metastatic neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors. *J Clin Oncol* 21:2689-96.

Fendrich V, Langer P, Celik I, Bartsch DK, Zielke A, Ramaswamy A, Rothmund (2006) An aggressive surgical approach leads to longterm survival in patients with pancreatic endocrine tumors. *Ann Surg* 244:845-51.

Feyrter F (1938) Über diffuse endokrine epitheliale Organe. Leipzig: Barth.

Feyrter F, Unna K (1936) Über den Nachweis eines blutdrucksteigernden Stoffes im Carcinoid. *Virchows Arch.* 298:187-94.

Fong D, Steurer M, Obrist P, Barbieri V, Margreiter R, Amberger A, Laimer K, Gastl G, Tzankov A, Spizzo G (2008) Ep-CAM expression in pancreatic and ampullary carcinomas: frequency and prognostic relevance. *J Clin Pathol* 61:31-5.

Frank M, Klose KJ, Wied M, Ishaque N, Schade-Brittinger C, Arnold R (1999) Combination therapy with octreotide and alpha-interferon: effect on tumor growth in metastatic endocrine gastroenteropancreatic tumors. *Am J Gastroenterol* 94:1381-7.

Fuchs M, Schepp W (2008) Importance of endoscopy and endosonography for chronic pancreatitis and benign pancreas tumors. *Radiologe* 48:721-4; 726-31

Gastl G, Spizzo G, Obrist P, Dünser M, Mikuz G (2000) EpCAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *Lancet* 356:1981-2.

Geer RJ, Brennan MF (1993) Prognostic indicators for survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg* 165:68-72.

Gerdes J, Dallenbach F, Lennert K, Lemke H, Stein H (1984a) Growth fractions in malignant non-Hodgkin's lymphomas (NHL) as determined in situ with the monoclonal antibody Ki-67. *Hematol Oncol* 2:365-71.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984b) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-5.

Gimm O, Koch CA, Januszewicz A, Opocher G, Neumann HP (2004) The genetic basis of pheochromocytoma. *Front Horm Res* 31:45-60.

- Gorges TM, Tinhofer I, Drosch M, Rose L, Zollner TM, Krahn T, Von Ahsen O (2012) Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 12:178.
- Gosens MJ, Van Kempen LC, Van De Velde CJ, Van Krieken JH, Nagtegaal ID (2007) Loss of membranous EpCAM in budding colorectal carcinoma cells. *Mod Pathol* 20:221-32.
- Gosset A, Masson P (1914) Tumeurs endocrines de l'appendice. *Presse Med* 22:237-40.
- Gregorc V, Spreafico A, Floriani I, Colombo B, Ludovini V, Pistola L, Bellezza G, Vigano MG, Villa E, Corti A (2007) Prognostic value of circulating chromogranin A and soluble tumor necrosis factor receptors in advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 110:845-53.
- Grenacher L, Klauss M (2009) Computed tomography of pancreatic tumors. *Radiologe* 49:107-23.
- Gutmann DH, Aylsworth A, Carey JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE, Rubenstein A, Viskochil D (1997) The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA* 278:51-7.
- Hassan MM, Phan A, Li D, Dagohoy CG, Leary C, Yao JC (2008) Risk factors associated with neuroendocrine tumors: A U.S.-based case-control study. *Int J Cancer* 123:867-73.
- Hellmann P, Lundström T, Ohrvall U, Eriksson B, Skogseid B, Oberg K, Tiensuu Janson E, Akerström G (2002) Effect of surgery on the outcome of midgut carcinoid disease with lymph node and liver metastases. *World J Surg* 26:991-7.
- Heidenhain R (1870) Untersuchungen über den Bau der Labdrüsen. *Arch Mikrosk Ant* 6:368-406.
- Herlyn D, Herlyn M, Steplewski Z, Koprowski H (1979) Monoclonal antibodies in cell-mediated cytotoxicity against human melanoma and colorectal carcinoma. *Eur J Immunol* 9:657-9.
- Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C (2007) Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* 1:313-23.

- High AS, Robinson, PA, Klein CE (1996) Increased expression of a 38kd cell- surface glycoprotein MH99 (KS ¼) in oral mucosal dysplasias. J Oral Pathol Med 25:10-3.
- Hochwald S, Zee S, Conlon KC, Colleoni R, Louie O, Brennan MF, Klimstra DS (2004) Prognostic factors in pancreatic neuroendocrine neoplasms: an analysis of 136 cases with a proposal for low-grade and intermediate grade groups. J Clin Oncol 20:2633-42.
- Hökfelt T, Johansson O, Ljungdahl A, Lundberg JM, Schultzberg M (1980) Peptidergic neurones. Nature 284:515-21.
- Hsu FD, Nielsen TO, Alkushi A, Dupuis B, Huntsman D, Long Liu C, van de Rijn M, Gilks B (2002) Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. Mod Pathol 15:1374-80.
- Huson SM, Hughes RAC (1994) The neurofibromatoses: a pathogenetic and clinical overview. London: Chapman & Hall.
- Iliopoulos O, Ohh M, Kaelin WG Jr (1998) pVHL19 is a biologically active product of the von Hippel-Lindau gene arising from internal translation initiation. Proc Natl Acad Sci U S A 95:11661-6.
- Khan MS, Tsigani T, Rashid M, Rabouhans [HYPERLINK "https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Rabouhans+JS"](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Rabouhans+JS) [HYPERLINK "https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Rabouhans+JS&cauthor\\_id=21224371"](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Rabouhans+JS&cauthor_id=21224371) & [HYPERLINK "https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Rabouhans+JS&cauthor\\_id=21224371"](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Rabouhans+JS&cauthor_id=21224371) author\_id=21224371" JS, Yu D, Luong TV, Caplin M, Meyer T (2011) Circulating tumor cells and EpCAM expression in neuroendocrine tumors. Clin Cancer Res 17: 337-45.
- Khan MS, Kirkwood A, Tsigani T, Garcia-Hernandez J, Hartley JA, Caplin ME, Meyer T (2013) Circulating tumor cells as prognostic markers in neuroendocrine tumors. Clin Cancer Res 31:365-72.
- Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G (2001) Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. Hum Mol Genet 10:657-62.
- Kasprzak A, Zabel M, Biczysko W (2007) Selected markers (chromogranin A, neuron-specific enolase, synaptophysin, protein gene product 9.5) in diagnosis and prognosis of neuroendocrine pulmonary tumours. Pol J Pathol 58:23-33.

- Kimura H, Kato H, Faried A, Sohda M, Nakajima M, Fukai Y, Miyazaki T, Masuda N, Fukuchi M, Kuwano H (2007) Prognostic significance of EpCAM expression in human esophageal cancer. *Int J Oncol* 30:171-9.
- Klein WM, Hruban RH, Klein-Szanto AJ, Wilentz RE (2002) Direct correlation between proliferative activity and dysplasia in pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN): additional evidence for a recently proposed model of progression. *Mod Pathol* 15:441-47.
- Klimstra D, Modlin I, Coppola D, Lloyd RV, Suster S (2010) The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas* 39:707-12.
- Klöpffel H, Heitz PU (1981) Die disseminierten (diffusen) endokrinen Zellen. In Dörr W, Seiffert (ed.): *Spezielle Pathologische Anatomie*, Berlin: Springer, 1097-135.
- Klöpffel G, Heitz PU, Capella C, Solcia E (1996) Pathology and nomenclature of human gastrointestinal neuroendocrine (carcinoid) tumors and related lesions. *World J Surg.* 20:132-41.
- Klöpffel G, Anlauf M, Lüttges J (2004) Klassifikation und Pathologie der neuroendokrinen Tumoren des Magen-Darm-Trakts und Pankreas. *Onkologe* 10:570-9.
- Klöpffel G, Anlauf M (2005) Epidemiology, tumour biology and histopathological classification of neuroendocrine tumours of the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 19:507-17.
- Klöpffel G, Couvelard A, Perren A, Komminoth P, McNicol AM, Nilsson O, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B, Papotti M, Rindi G, Plöckinger U (2009) ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: towards a standardized approach to the diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and their prognostic stratification. *Neuroendocrinology* 90:162-6.
- Klöpffel G, Rindi P, Perren A, Komminoth P, Klimstra DS (2010) The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: a statement. *Virchows Arch* 456:595-97.

- Kölby L, Persson G, Franzen S, Ahren B (2003) Randomized clinical trial of the effect of interferon- $\alpha$  on survival in patients with disseminated midgut carcinoid tumours. *Brit J Surg* 90:687-93.
- Knoefel WT, Gabor I, Rehders A, Alexander A, Krausch M, Schulte am Esch J, Fürst G, Topp SA (2013) In situ liver transection with portal vein ligation for rapid growth of the future liver remnant in two-stage liver resection. *Br J Surg* 100:388-94.
- Koopmans K, Brouwers A, De Hooge M, Van der Horst-Schrivers A, Kema I, Wolffenbuttel B, De Vries E, Jager P (2005) Carcinoid crisis after injection of 6-18F-fluorodihydroxyphenylalanine in a patient with metastatic carcinoid. *J Nucl Med* 46:1240-3.
- Krausch M, Raffel A, Anlauf M, Schott M, Lehwald N, Krieg A, Topp SA, Cupisti K, Knoefel WT (2014) „Cherry picking”, a multiple non-anatomic liver resection technique, as a promising option for diffuse liver metastases in patients with neuroendocrine [HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101025"](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101025) tumours [HYPERLINK "http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101025"](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24101025). *World J Surg* 38:392-401.
- Krejs GJ (1987) Gastrointestinal endocrine tumors. *Am J Med* 82:1-3.
- Kuhn S, Koch M, Nubel T, Ladwein M, Antolovic D, Klingbeil P, Hildebrand D, Moldenhauer G, Langbein L, Franke WW, Weitz J, Zöller M (2007) A complex of EpCAM, claudin-7, CD44 variant isoforms, and tetraspanins promotes colorectal cancer progression. *Mol Cancer Res* 5:553-67.
- Kulke MH, Mayer RJ (1999) Carcinoid tumors. *New Eng J Med* 340:858-68.
- Kulschitzky N (1897) Zur Frage über den Bau des Darmkanals. *Arch Microsk Anat* 49:70-35.
- Kvols LK, Buck M, Moertel CG, Schutt AJ, Rubin J, O'Connell MJ, Hahn RG (1987) Treatment of metastatic islet cell carcinoma with a somatostatin analogue (SMS 201- 995). *Ann Intern Med* 107:162-8.
- Labalette C, Renard CA, Neuveut C, Buendia MA, Wei Y (2004) Interaction and functional cooperation between the LIM protein FHL2, CBP/p300, and beta-catenin. *Mol Cell Biol* 24:10689-702.

- Lapidot, T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367:645-8.
- Latif F, Tory K, Gnarra J, Yao M, Duh F.M, Orcutt M.L, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L (1993) Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene [see comments]. *Science* 260:1317-20.
- Lebe B, Sağol O, Ulukuş C, Coker A, Karademir S, Astarcioglu H, Küpelioglu A, Astarcioglu I, Obuz F (2004) The importance of cyclin D1 and Ki-67 expression on the biological behavior of pancreatic adenocarcinomas. *Pathol Res Pract* 200:389-96.
- Lembeck F (1953) 5-Hydroxytryptamine in a carcinoid tumour. *Nature* 172:910-1.
- Le Naour F, Andre M, Greco C, Billard M, Sordat B, Emile JF, Lanza F, Boucheix C, Rubinstein E (2006) Profiling of the tetraspanin web of human colon cancer cells. *Mol Cell Proteomics* 5:845-57.
- Lerman M (2001) *VHL Protein Function in Health and Disease*. New York: John Wiley and Sons.
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67:1030-7.
- Litvinov SV, Bakker HA, Gourevitch MM, Velders MP, Warnaar SO (1994a) Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun* 2:417-28.
- Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO (1994b) Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 125:437-46.
- Litvinov SV, Van Driel W, Van Rhijn CM, Bakker HA, Van Krieken H, Fleuren GJ, Warnaar SO (1996) Expression of EpCAM in cervical squamous epithelia correlates with an increased proliferation and the disappearance of markers for terminal differentiation. *Am J Pathol* 148:865-75.



[5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"cauthor\\_uid=25479584"Cutsem](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Van%20Cutsem%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25479584)  
HYPERLINK ["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Van%20Cutsem%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"&](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Van%20Cutsem%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25479584) HYPERLINK  
["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Van%20Cutsem%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"cauthor=true](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Van%20Cutsem%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25479584) HYPERLINK  
["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Van%20Cutsem%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"&](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Van%20Cutsem%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25479584) HYPERLINK  
["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Van%20Cutsem%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"cauthor\\_uid=25479584" E, Wolin EM, Panneerselvam](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Van%20Cutsem%20E%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25479584) HYPERLINK ["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Panneerselvam%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"&](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Panneerselvam%20A%5BAuthor%5D) HYPERLINK  
["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Panneerselvam%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"cauthor=true](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Panneerselvam%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25479584) HYPERLINK  
["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Panneerselvam%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"&](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Panneerselvam%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25479584) HYPERLINK  
["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Panneerselvam%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"cauthor\\_uid=25479584" A, Stergiopoulos](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Panneerselvam%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25479584) HYPERLINK ["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stergiopoulos%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"&](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stergiopoulos%20S%5BAuthor%5D) HYPERLINK  
["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stergiopoulos%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"cauthor=true](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stergiopoulos%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25479584) HYPERLINK  
["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stergiopoulos%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"&](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stergiopoulos%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25479584) HYPERLINK  
["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stergiopoulos%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"cauthor\\_uid=25479584" S, Shah MH, Capdevila](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Stergiopoulos%20S%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25479584) HYPERLINK ["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Capdevila%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"&](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Capdevila%20J%5BAuthor%5D) HYPERLINK  
["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Capdevila%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"cauthor=true](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Capdevila%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25479584) HYPERLINK

uthor=true&cauthor\_uid=25479584"& HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Capdevila%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\_uid=25479584"cauthor=true HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Capdevila%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\_uid=25479584"& HYPERLINK

"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Capdevila%20J%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\_uid=25479584"cauthor\_uid=25479584" J, Pommier

HYPERLINK ["http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pommier%20R%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor\\_uid=25479584"](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pommier%20R%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=25479584) R (2015) Impact of prior

chemotherapy use on the efficacy of everolimus in patients with advanced pancreatic neuroendocrine tumors: a subgroup analysis of the phase III RADIANT-3 trial. *Pancreas* 44:181-9.

Los M, Jansen GH, Kaelin WG, Lips CJ, Blijham GH, Voest EE (1996) Expression pattern of the von Hippel-Lindau protein in human tissues. *Lab Invest* 75:231-8.

Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O (2009) Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat Cell Biol* 11:162-71.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133:704-15.

Marshall JB, Bodnarchuk G (1993) Carcionoid tumors of the gut. Our experience over three decades and review of the literature. *J Clin Gastroenterol* 16:123-29.

Martin B, Schneider R, Janetzky S, Waibler Z, Pandur P, Kuhl M, Behrens J, von der Mark K, Starzinski-Powitz A, Wixler V (2002) The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *J Cell Biol* 159:113-22.

Michalides RJ, van de Brekel M, Balm F (2002) Defects in G1-S cell cycle control in head and neck cancer: a review. *Head Neck* 24:694-704.

Milanes-Yearsley M, Hammond ME, Pajak TF, Cooper JS, Chang C, Griffin T, Nelson D, Laramore G, Pilepich M (2002) Tissue micro-array: a cost and time-effective

- method for correlative studies by regional and national cancer study groups. *Mod Pathol* 15:1366-73.
- Mirlacher M, Storz M (2000) „Gewebe-Chips“ für die molekulare Herstellung von Tumoren. *Histo J* 19:7-18.
- Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G (2001) Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol* 8:14-20.
- Modlin I, Kidd M, Latich I, Zikusoka M, Shapiro M (2005) Current status of gastrointestinal carcinoids. *Gastroenterology* 128:1717-51.
- Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker R, Chaplin M, Delle Fave G, Kaltsas GA, Krenning EP, Moss SF, Nilsson O, Rindi G, Salazar R, Ruszniewski P, Sundin A (2008) Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumours. *Lancet Oncol* 9:61-72.
- Moertel CG (1987) An odyssey in the land of small tumors. *J Clin Oncol* 5:1503-22.
- Mumm JS, Kopan R (2000) Notch signaling: from the outside in. *Dev Biol* 228:151-65.
- Munz M, Kieu C, Mack B, Schmitt B, Zeidler R, Gires O (2004b) The carcinoma associated antigen EpCAM upregulates c-myc and induces cell proliferation. *Oncogene* 23:5748-58.
- Munz M, Fellingner K, Hofmann T, Schmitt B, Gires O (2008) Glycosylation is crucial for stability of tumour and cancer stem cell antigen EpCAM. *Front Biosci* 13:5195-201.
- Munz M, Baeuerle PA, Gires O (2009) The emerging role of EpCAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res* 69:5627-9.
- Namwongprom S, Wong FC, Tateishi U, Kim EE, Boonyaprapa S (2008) Correlation of chromogranin A levels and somatostatin receptor scintigraphy findings in the evaluation of metastases in carcinoid tumors. *Ann Nucl Med* 22:237-43.
- Nocito A, Bubendorf L, Maria Tinner E, Süess K, Wagner U, Forster T, Kononen J, Fijan A, Bruderer J, Schmid U, Ackermann D, Maurer R, Alund G, Knönagel H, Rist M, Anabitarte A, Hering F, Hardmeier T, Schoenenberger AJ, Flury R, Jäger P, Fehr JL, Schraml P, Moch H, Mihatsch MJ, Gasser T, Sauter G (2001a) Microarrays of bladder cancer tissue are highly representative of proliferation index and histological grade. *J Pathol* 194:349-57.

- Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G (2001b) Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer* 94:1-5.
- Oberndorfer S (1907) Karzinoide Tumoren des Dunndarms. *Frankf Z Pathol* 1:425-32.
- Öberg KB, Eriksson B, Janson ET (1994) Interferon alone in combination with chemotherapy or other biologicals in the treatment of neuroendocrine gut and pancreatic tumors. *Digestion* 3:64-9.
- Öberg K (1996) Neuroendocrine gastrointestinal tumors. *Ann Oncol* 7:453-63.
- Öberg K, Jelic S (2008) Neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 19 Suppl 2:ii104-5.
- Ohike N, Morohoshi T (2005) Pathological assessment of pancreatic endocrine tumors for metastatic potential and clinical prognosis. *Endocr. Pathol* 16:33-40.
- Onaitis MW, Kirshbom PM, Hayward TZ, Quayle FJ, Feldman JM, Seigler HF, Tyler DS (2000) Gastrointestinal carcinoids: characterization by site of origin and hormone production. *Ann Surg* 232:549-56.
- Page IH, Corcoran AC, Udenfried S, Szeodsma A, Weissbach H (1955) Argentaffinoma as endocrine tumour. *Lancet* 268:198-9.
- Palagani, V, El Khatib BM, Kossatz U, Bozko P, Muller MR, Manns MP, Krech T, Malek NP, Plentz RR (2012) Epithelial mesenchymal transition and pancreatic tumor initiating CD44+/EpCAM+ cells are inhibited by  $\gamma$ -Secretase inhibitor IX. *PLoS One* 7:e46514.
- Pape UF, Berndt U, Muller-Nordhorn J, Bohmig M, Roll S, Koch M, Willich SN, Wiedenmann B (2008) Prognostic factors of long-term outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 15:1083-97.
- Partensky C, Landraud R, Velecela E, Souquet JC (1990) Resection of carcinoid tumours of the small intestine is still indicated in the presence of disseminated hepatic metastases. *Ann Chir* 44:34-8.
- Pauli C, Munz M, Kieu C, Mack B, Breinl P, Wollenberg B, Lang S, Zeidler R, Gires O (2003) Tumor-specific glycosylation of the carcinoma-associated epithelial cell adhesion molecule EpCAM in head and neck carcinomas. *Cancer Lett* 193:25-2.

- Pearse AGE (1969) The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic and pathologic implications of the concept. *J Histochem Cytochem* 17:303-13.
- Pelosi G, Bresaola E, Bogina G, Pasini F, Rodella S, Castelli P, Iacono C, Serio G, Zamboni G (1996) Endocrine tumors of the pancreas: Ki-67 immunoreactivity on paraffin sections is an independent predictor for malignancy: a comparative study with proliferating-cell nuclear antigen and progesterone receptor protein immunostaining, mitotic index, and other clinicopathologic variables. *Hum Pathol* 27:1124-34.
- Perret GA, Mosnier JF, Buono JP, Berthelot P, Chipponi J, Balique JG, Cuilleret J, Dechelotte P, Boucheron S (1998) The relationship between MIB-1 proliferation index and outcome in pancreatic neuroendocrine tumors. *Am J Clin Pathol* 109:286-93.
- Petsch S, Gires O, Ruttinger D, Denzel S, Lippold S, Baeuerle PA, Wolf A (2011) Concentrations of EpCAM ectodomain as found in sera of cancer patients do not significantly impact redirected lysis and T-cell activation by EpCAM/CD3-bispecific BiTE antibody MT110. *MAbs* 3:31-7.
- Plöckinger U, Kloepfel G, Wiedenmann B, Lohmann R (2009a) The German NET-registry: an audit on the diagnosis and therapy of neuroendocrine tumors. *Neuroendocrinology* 90:349-63.
- Plöckinger U, Wiedenmann B, de Herder WW (2009b) ENETS Consensus Guidelines for the Standard of Care in Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology*. 90:159-61.
- Raffel A, Krausch M, Anlauf M, Wieben D, Braunstein S, Klöppel G, Röher HD, Knoefel WT (2007) Diffuse nesidioblastosis as a cause of hyperinsulinemic hypoglycemia in adults: a diagnostic and therapeutic challenge. *Surgery* 141:179-84.
- Ramage JK, Davies AH, Ardill J, Bax N, Caplin M, Grossman A, Hawkins R, McNicol AM, Reed N, Sutton R, Thakker R, Aylwin S, Breen D, Britton K, Buchanan K, Corrie P, Gillams A, Lewington V, McCance D, Meeran K, Watkinson A (2005) Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumours. *Gut* 54 Suppl 4:1-16.

- Ramage JK, Goretzki PE, Manfredi R, Komminoth P, Ferone D, Hyrdel R, Kaltsas G, Kelestimir F, Kvols L, Scoazec JY, Garcia MIS, Caplin ME (2008) Consensus guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine tumours: well-differentiated colon and rectum tumour/carcinoma. *Neuroendocrinology* 87:31-9.
- Ranson WB (1890) A case of primary carcinoma of the ileum. *Lancet* 2:1020.
- Rapport MM, Green AA, Page IC (1948) Serum vasoconstrictor (Serotonin). Isolation and characterization. *J Biol Chem* 176:1243-51.
- Raymond E, Dahan L, Raoul JL, Bang YJ, Borbath I, Lombard-Bohas C, Valle J, Metrakos P, Smith D, Vinik A, Chen JS, Hörsch D, Hammel P, Wiedenmann B, Van Cutsem E, Patyna S, Lu DR, Blanckmeister C, Chao R, Ruzniewski P (2011) Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 364:501-13.
- Richards FM, Schofield PN, Fleming S, Maher ER (1996) Expression of the von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene during human embryogenesis. *Hum Mol Genet* 5:639-44.
- Rindi G, Klöppel G, Ahlman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, Eriksson B, Falchetti A, Falconi M, Komminoth P, Körner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B, all other Frascati Consensus Conference participants; European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) (2006) TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 449:395-401.
- Rindi G, Klöppel G, Couvelard A, Komminoth P, Körner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B (2007) TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch* 451:757-62.
- Robiolo P, Rigolin V, Wilson J, Harrison J, Sanders L, Bashore T, Feldman J (1995) Carcinoid heart disease. Correlation of high serotonin levels with valvular abnormalities detected by cardiac catheterization and echocardiography. *Circulation* 92:790-5.
- Rosen JM, Jordan CT (2009) The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 324:1670-3.

- Saif MW (2011) Pancreatic neoplasm in 2011: an update. *JOP* 12:316-21.
- Sakashita N, Takeya M, Kishida T, Stackhouse TM, Zbar B, Takahashi K (1999) Expression of von Hippel-Lindau protein in normal and pathological human tissues. *Histochem J* 31:133-44.
- Schiechl H, Dohr G, Eherer A (1986) Immunohistochemical localization and characterization of a protein from the basolateral membrane of rat small intestine epithelium using monoclonal antibody GZ-1. *J Histochem Cytochem* 34:1659-65.
- Schmetzer O, Moldenhauer G, Nicolaou A, Schlag P, Riesenberger R, Pezzutto A (2012) Detection of circulating tumor associated antigen depends on the domains recognized by the monoclonal antibodies used: N-terminal trimmed EpCAM-levels are much higher than untrimmed forms. *Immunol Lett* 143:184-92.
- Schmidt M, Hasenclever D, Schaeffer M, Boehm D, Cotarelo C, Steiner E, Lebrecht A, Siggelkow W, Weikel W, Schifferpetry I, Gebhard S, Pilch H, Gehrmann M, Lehr HA, Koelbl H, Hengstler JG, Schuler M (2008) Prognostic effect of epithelial cell adhesion molecule overexpression in untreated node- negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 14:5849-55.
- Schoenfeld A, Davidowitz EJ, Burk RD (1998) A second major native von Hippel-Lindau gene product, initiated from an internal translation start site, functions as a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8817-22.
- Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol* 182:311-22.
- Schürmann G, Räth U, Wiedenmann B, Buhr H, Herfarth C (1992) Serum chromogranin A in the Diagnosis and follow-up of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic tract. *World J Surg* 16:697-702.
- Schwarting R (1993) Little missed markers and Ki-67. *Lab Invest* 68:597-9.
- Seligson DB, Pantuck AJ, Liu X, Huang Y, Horvath S, Bui MH, Han KR, Correa AJ, Eeva M, Tze S, Belldegrun AS, Figlin RA (2004) Epithelial cell adhesion molecule (KSA) expression: pathobiology and its role as an independent predictor of survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 10:2659-69.

- Shan L, Nakamura Y, Nakamura M, Yokoi T, Tsujimoto M, Arima R, Kameya T, Kakudo K (1998) Somatic mutations of multiple endocrine neoplasia type 1 gene in the sporadic endocrine tumors. *Lab Invest* 78:471-5.
- Stanton KJ, Sidner RA, Miller GA, Cummings OW, Schmidt M, Howard TJ, Wiebke EA (2003): Analysis of Ki-67 antigen expression, DNA proliferative fraction, and survival in resected cancer of the pancreas. *The American Journal of Surgery*, 186:486-92.
- Shebani KO, Souba WW, Finkelstein DM, Stark PC, Elgadi KM, Tanabe KK, Ott MJ (1999) Prognosis and survival in patients with gastrointestinal tract carcinoid tumors. *Ann Surg* 229:815-21; discussion 822-3.
- Shepherd JJ (1991) The natural history of multiple endocrine neoplasia type 1. Highly uncommon or highly unrecognized? *Arch Surg* 126:935-52.
- Solcia EC, Capella R, Buffa R, Usellini L, Fiocca R, Frigerio B, Tenti P, Sessa F (1981) The diffuse endocrine-paracrine system of the gut in health and disease: ultrastructural features. *Scand J Gastroenterol Suppl* 70:25-36.
- Songun I, Litvinov SV, Van De Velde CJ, Pals ST, Hermans J, Van Krieken JH (2005) Loss of EpCAM (CO17-1A) expression predicts survival in patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 92:1767-72.
- Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Simon R, Spichtin H, Mauerer R, Metzger U, Von Castelberg B, Bart R, Stopatschinskaya S, Kochli OR, Haas P, Mross F, Zuber M, Dietrich H, Bischoff S, Mirlacher M, Sauter G, Gast G (2004) High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 86:207-13.
- Stanton KJ, Sidner RA, Miller GA, Cummings OW, Schmidt M, Howard TJ, Wiebke EA (2003) Analysis of Ki-67 antigen expression, DNA proliferative fraction, and survival in resected cancer of the pancreas. *Am J Surg* 186:486-92.
- Starborg, M, Gell, K, Brundell E, Höög C (1996) The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci* 109:143-53.
- Stoecklein NH, Siegmund A, Scheunemann P, Luebke AM, Erbersdobler A, Verde PE, Eisenberger CF, Peiper M, Rehders A, Schulte Am Esch J, Knoefel WT, Hosch SB

- (2006) EpCAM expression in squamous cell carcinoma of the esophagus: a potential therapeutic target and prognostic marker. *BMC Cancer* 6:165.
- Stumpf DA, Alksne JF, Annegers JF, Brown SS, Conneally PM, Housman D, Leppert MF, Miller JP, Moss ML, Pileggi AJ, Rapin I, Strohmman RC, Swanson LW, Zimmerman A (1988) Neurofibromatosis: conference statement. *Arch Neurol* 45:575-8.
- Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Wijffels K, Schuurin E, Litvinov SV, Hermans J, van Krieken JH (2001) Expression of genetic markers in lymph node metastases compared with their primary tumours in head and neck cancer. *J Pathol* 194: 298-302.
- Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (2003) The chromogranin secretogranin family. *N Engl J Med* 348:1134-49.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139:871-90.
- Tomoda, H, Furusawa, M, Hayashi I (1989) The policy of surgery for small carcinoid tumors of the rectum. *Jpn J Surg* 19:544-8.
- Tonelli F, Fratini G, Nesi G, Tommasi MS, Batignani G, Falchetti A, Brandi ML (2006) Pancreatectomy in multiple endocrine neoplasia type 1-related gastrinomas and pancreatic endocrine neoplasias. *Ann Surg* 244:61-70.
- Trzpis M, McLaughlin PM, De Leij LM, Harmsen MC (2007) Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* 171:386-95.
- Turaga KK, Kvols LK (2011) Recent progress in the understanding, diagnosis and treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *CA Cancer J Clin* 61:113-32.
- Van Der Gun BT, Melchers LJ, Ruiters MH, De Leij LF, McLaughlin PM, Rots MG (2010) EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis* 31:1913-21.
- Varga M, Obrist P, Schneeberger S, Muhlmann G, Felgel-Farnholz C, Fong D, Zitt M, Brunhuber T, Schafer G, Gastl G, Spizzo G (2004) Overexpression of epithelial

cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. *Clin Cancer Res* 10:3131-6.

Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA (1990) Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell* 62:187-92.

Went PT, Lugli A, Meier S, Bundi M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S (2004) Frequent EpCAM protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 35:122-8.

Went P, Dirnhofer S, Salvisberg T, Amin MB, Lim SD, Diener PA, Moch H (2005) Expression of epithelial cell adhesion molecule (EpCam) in renal epithelial tumors. *Am J Surg Pathol* 29:83-8.

Went P, Vasei M, Bubendorf L, Terracciano L, Tornillo L, Riede U, Kononen J, Simon R, Sauter G, Baeuerle PA (2006) Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer* 94:128-35.

Westberg G, Wängberg B, Ahlman H, Bergh CH, Beckman-Suurküla M, Caidahl K (2001) Prediction of prognosis by echocardiography in patients with midgut carcinoid syndrome. *Br J Surg* 88:865-72.

Wiedenmann B, Jensen RT, Mignon M, Modlin CI, Skogseid B, Doherty G, Oberg K (1998) Preoperative diagnosis and surgical management of neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors: general recommendations by a consensus workshop. *World J Surg* 22:309-18.

Williams ED, Sandler M (1963) The classification of carcinoid tumours. *Lancet* 1:238-9.

Williams GT (2007) Endocrine tumours of the gastrointestinal tract-selected topics. *Histopathology* 50:30-41.

Winter MJ, Nagelkerken B, Mertens AE, Rees-Bakker HA, Briaire-de Bruijn IH, Litvinov SV (2003a) Expression of Ep-CAM shifts the state of cadherin-mediated adhesions from strong to weak. *Exp Cell Res* 285:50-8.

Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Litvinov SV (2003b) The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol* 163:2139-48.

Yalow RS, Berson SA (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J Clin Invest 39:1157-75.

Yamashita T, Budhu A, Forgues M, Wang XW (2007) Activation of hepatic stem cell marker EpCAM by Wnt-beta-catenin signaling in hepatocellular carcinoma. Cancer Res 67:10831-9.

Yamashita T, Ji J, Budhu A, Forgues M, Yang W, Wang HY, Jia H, Ye Q, Qin LX, Wauthier E, Reid LM, Minato H, Honda M, Kaneko S, Tang ZY, Wang XW (2009) EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. Gastroenterology 136:1012-24.

Yao JC, Shah MH, Ito T, Lombard Bohas C, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevilla J, de Vries EGE, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Öberg K (2011) Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. N Engl J Med 364:514-23.

Zimmermann ME, Bosman FT (2003) Proliferative activity of well differentiated neuroendocrine tumours of the gut. Histol Histopathol 18:353-8.

Zorzos J, Zizi A, Bakiras A, Pectasidis D, Skarlos DV, Zorzos H, Elemenoglou J, Likourinas M (1995) Expression of a cell surface antigen recognized by the monoclonal antibody AUA1 in bladder carcinoma: an immunohistochemical study. Eur Urol 28:251-4.

Zuetenhorst JM, Taal BG (2005) Metastatic carcinoid tumors: a clinical review. Oncologist 10:123-31.

- 

- **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Herstellung des Tissue-Microarrays .....	39
Abb. 2:	Tissue-Microarray-Block (links) und Mikrotom rechts .....	40
Abb. 3:	EpCAM-Expression in Abhängigkeit vom Auftreten von Lymphknoten-(LN)-Metastasen .....	51
Abb. 4:	EpCAM-Expression in Abhängigkeit vom Auftreten regionaler und peripheren Lymphknoten-(LN)-Metastasen .....	51
Abb.5:	EpCAM-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation der Lymphknoten-(LN)-metastasen .....	52
Abb. 6:	EpCAM-Expression in Abhängigkeit vom Auftreten von Fernmetastasen	53

Abb. 7:	EpCAM-Expression beim Auftreten von Fernmetastasen in der Lunge und im Peritoneum.....	53
Abb. 8:	EpCAM-Expression in Abhängigkeit von der Lokalisation der Fernmetastasen.....	54
Abb. 9:	EpCAM-Expression in Abhängigkeit vom Tumorstadium .....	55
Abb. 10:	EpCAM-Expression in Abhängigkeit von der WHO-Klassifikation .....	56
Abb. 11:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Leber- oder Lymphknoten-(LN)-metastasen (Kaplan-Meier-Kurve) ..	59
Abb. 12:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Geschlecht (Kaplan-Meier-Kurve) .....	60
Abb. 13:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Alter (Kaplan-Meier-Kurve) – Vergleich von Patienten $\leq 50$ Jahre vs. $> 50$ Jahre .....	61
Abb. 14:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Alter (Kaplan-Meier-Kurve) – Vergleich von Patienten $\leq 57,5$ Jahre vs. $> 57,5$ Jahre ..	62
Abb. 15:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation (Kaplan-Meier-Kurve) – Vergleich von Patienten mit <i>fore-</i> , <i>mid</i> und <i>hindgut</i> Tumoren.....	63
Abb. 16:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der Tumorlokalisation (Kaplan-Meier-Kurve) – Vergleich von Patienten mit Darm-, Pankreas- und Tumoren anderer Lokalisation .....	64
Abb. 17:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Auftreten von Lymphknoten-(LN)-Metastasen (Kaplan-Meier-Kurve) .....	65
Abb. 18:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Auftreten von Fernmetastasen (Kaplan-Meier-Kurve).....	66
Abb. 19:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der Tumorgroße (Kaplan-Meier-Kurve).....	67
Abb. 20:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der TNM-Stadieneinteilung für kolorektale NET (Kaplan-Meier-Kurve) – T-Parameter .....	68
Abb. 21:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der TNM-Stadieneinteilung für kolorektale NET (Kaplan-Meier-Kurve) – N-Parameter .....	69
Abb. 22:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der TNM-Stadieneinteilung für kolorektale NET (Kaplan-Meier-Kurve) – M-Parameter .....	70
Abb. 23:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression (Kaplan-Meier-Kurve) – Patienten mit IRS-Score Werten $\leq 3$ versus $> 3$ .....	71
Abb. 24:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der Ki-67-Expression (Kaplan-Meier-Kurve) – Patienten mit IRS-Score Werten $\leq 2$ versus $> 2$ .....	72
Abb. 25:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom WHO-Stadium (Kaplan-Meier-Kurve) .....	73

Abb. 26:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Tumor- <i>Staging</i> (Kaplan-Meier-Kurve) .....	74
Abb. 27:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit vom Tumor- <i>Staging</i> (Kaplan-Meier-Kurve) .....	75
Abb. 28:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression (Kaplan-Meier-Kurve) – Patienten mit IRS-Score Werten $\leq$ 4 versus $>$ 4 .....	76
Abb. 29:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression (Kaplan-Meier-Kurve) – Patienten mit IRS-Score Werten $\leq$ 6,5 versus $>$ 6,5 .....	77
Abb. 30:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression (Kaplan-Meier-Kurve) – Patienten mit IRS-Score Werten $\leq$ 4 versus $>$ 4 .....	78
Abb. 31:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression (Kaplan-Meier-Kurve) – Patienten mit IRS-Score Werten $\leq$ 8 versus $>$ 8 .....	79
Abb. 32:	Analyse der Überlebenszeit (Tage) in Abhängigkeit von der EpCAM-Expression (Kaplan-Meier-Kurve) – Patienten mit IRS-Score Werten 0–4 versus 6–8 versus 12.....	80

•

## • Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Klassifikation neuroendokriner Tumoren (NET) .....	14
Tab. 2:	TNM-Stadieneinteilung für kolorektale Neuroendokrine Tumoren (NET). ..	15
Tab. 3:	Staging für neuroendokrine Tumoren (NET) von Kolon und Rektum.....	15
Tab. 4:	Grading für gastro-entero-pankreatische neuroendokrine Tumoren (GEP-NET) aus Ileum, Appendix, Kolon und Rektum.....	16
Tab. 5:	WHO- (2010) und ENETS-Klassifikation für gastro-entero-pankreatische neuroendokrine Tumoren (GEP-NET) und Pankreas-NET / Grading System nach ENETS (2006/07) [Bubendorf et al. 2001]..	16
Tab. 6:	Diagnostik gastro-entero-pankreatischer neuroendokriner Tumoren (GEP-NEN) .....	26
Tab. 7:	Therapiemöglichkeiten bei Patienten mit neuroendokrinen Tumoren .....	28
Tab. 8:	Immunreaktiver Score (Remmele-Score) .....	46
Tab. 9:	Primärtumoren, Lymphknoten-(LN)- und Fernmetastasen .....	48
Tab. 10:	TNM-Stadium der Patienten .....	49
Tab. 11:	Grading, WHO-Klassifikation und Tumorstadium .....	49
Tab. 12:	Ki67-Expression.....	49
Tab. 13:	EpCAM-Expression .....	50

Tab. 14: Potentielle Einflussfaktoren auf das Überleben (univariate Cox-Regressionsanalyse) ..... 57

Tab. 15: Multivariate Analysen zum Überleben nach Erstdiagnose ..... 58

•

• **Anhang**

Tab. A1: Erhobene Patientendaten

Einteilung	No.	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Histologie Hauptdiagnose *1	Hauptdiagnose *2	Hauptdiagnose *3	Hauptdiagnose *4	LN-Metastasen *5	Fern-Metastasen *6	Fern-Metastasen *7	Tumorgröße in cm	T	N	M	Ki-67	Grading	WHO	Erkrankungsstadium *8	Erkrankungsstadium *9	EPCAM-Expression	Ki-67-Expression	Überleben (Monate)	verstorben = 0 überlebt = 1
Haupttumor	1	2	34	3	1	2	1	0	1	1	2	2	0	0	2,5	2	1	2	1	0	0	135	1
	2	1	49	3	1	2	1	0	1	1	8,5	1	0	0	6	2	1	1	1	0	0	k.a.	k.a.
	3	1	57	3	1	2	1	2	4	2	5	3	1	1	5	2	2	6	3	4	1	36	0
	4	1	47	3d	1	2	1	0	4	2	6,2	2	0	1	6,2	2	1	3	2	1	2	108	0
	5	2	55	3	1	2	1	1	1	1	2,4	1	0	0	2,4	2	1	1	1	6	3	123	1
	6	1	69	3	1	2	1	0	0	0	9	1	0	0	9	2	1	3	2	8	0	127	1
	7	1	72	3	1	2	1	0	0	0	5,5	2	0	0	2,5	2	2	3	2	0	0	174	1
	8	1	25	3	1	2	1	0	0	0	4	1	0	0	2	2	1	1	1	4	1	5	0
	9	1	65	3	1	2	1	2	4	2	4	4	1	1	4,0	2	3	6	3	4	0	104	1
	10	1	62	3	1	2	1	2	4	2	10	3	1	1	10,0	2	2	6	3	12	0	80	0
	11	2	53	3	1	2	1	2	4	2	4	4	1	1	4,0	2	2	6	3	6	2	80	0
	12	1	38	3	1	2	1	0	0	0	2	1	0	0	2,0	2	2	5	2	6	0	164	1

13	2	63	3e	1	2	1	0	0	0	2	2	0	0	2,0	2	1	2	1	0	0	106	0
14	2	57	3	1	2	1	1	1	1	1	1	0	0	1,0	2	1	1	1	8	3	133	1
15	1	58	3	1	2	1	2	1	1	4	2	1	0	4,0	2	2	5	2	6	2	57	0
16	1	46	3	1	2	1	0	4	2	4	4	1	1	4	2	2	6	3	3	k.A.	38	0
17	1	58	3	1	2	1	2	1	1	1,5	1	1	1	1,5	1	3	6	3	0	2	8	0
18	2	43	3	1	2	1	3	1	1	7	4	1	1	7,0	2	2	5	2	0	0	165	1
19	2	63	3	1	2		2	1	1	4,5	3	1	0	3,0	2	2	2b	2	0	2	1	0
20	2	64	3	1	2	1	2	4	2	4	4	1	1	4,0	2	3	6	3	k.A.	k.A.	7	0
21	1	62	3	1	2	1	1	1	1	3	2	0	0	3,0	2	1	3	2	6	3	100	1
22	1	64	3	1	2	1	0	0	0	7,8	2	0	0	7,8	2	1	3	2	6	2	201	1
23	2	42	3	1	2	1	0	0	0	1,5	1	0	0	2,0	2	1	1	1	0	0	22	0
24	2	67	3	1	2	1	1	1	1	3,5	2	0	0	3,5	2	1	2	1	1	2	134	1
25	2	54	3	1	2	1	0	4	2	3,5	4	1	1	3,0	2	2	3	2	0	2	47	0

Fortsetzung Tabelle A1: Erhobene Patientendaten

Einteilung	N	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Histologie Hauptdiagnose*1	Hauptdiagnose**2	Hauptdiagnose**3	Hauptdiagnose**4	LN-Metastasen*5	Fern-Metastasen*6	Fern-Metastasen*7	Tumorgroße in cm	T	N	N	Ki-67	Grading	WHO	Erkrankungsstadium*8	Erkrankungsstadium*9	EpCAM-Expression	Ki-67-Expression	Überleben (Monate)	verstorben = 0 überlebt = 1
Hau	26	1	38	3	1	2	1	2	4	2	4,5	3	1	1	2,5	2	2	6	3	6	3	168	1

pt - tu mor	27	1	36	3	1	2	1	2	4	2	9	3	1	1	3,2	2	3	6	3	0	3	22	0	
	28	1	13	3	1	2	1	1	1	1	2,8	3	1	1	2,8	2	1	2	1	4	3	169	1	
	29	1	30	3	1	2	1	1	1	1	3,2	2	0	0	2,0	2	1	1	1	1	0	0	114	1
	30	1	50	3	1	2	1	2	4	2	2,2	2	1	1	3,5	2	2	6	3	12	3	52	0	
	31	2	79	3	1	2	1	2	1	1	4,5	2	1	0	3,0	2	2	5	2	12	0	83	1	
	32	2	28	3d	1	2	1	0	0	0	9	2	0	0	2,5	2	2	3,0	2	1	0	0	k. A.	k. A.
	33	1	59	3	1	2	1	2	4	2	7	4	1	1	7,0	2	3	6	3	12	3	8	0	
	34	1	59	3	1	2	1	2	4	2	1,5	1	2	1	3,0	2	2	6	3	12	2	92	1	
	35	2	26	3	1	2	1	2	5	5	15	3	1	1	1,0	2	2	6	3	12	0	26	1	
	36	1	72	3	1	2	1	0	0	0	4	3	0	0	4,0	2	2	4	3	0	6	4	0	
	37	2	54	3	1	2	1	0	4	2	23	4	0	1	2,8	2	3	6	3	8	3	6	0	
	38	2	66	3	1	2	1	2	4	2	3,5	3	1	1	5,0	2	2	6	3	0	0	59	0	
	39	2	61	3	1	2	1	2	4	2	6,2	3	1	1	4,0	2	3	6	3	k. A.	3	15	0	
	40	1	55	5	1	2	1	2	1	1	3	4	1	1	3,3	2	2	5	2	8	3	27	0	
	41	2	45	5	1	2	1	2	1	1	1,5	1	1	0	1,5	2	2	5	2	8	3	181	1	
	42	1	71	5	1	2	1	0	0	0	3	2	0		3,0	2	1	2	1	k. A.	0	210	1	
	43	2	51	5	1	2	1	2	1	1	4,5	3	1	1	2,0	2	2	5	3	k. A.	2	77	0	
	44	2	47	5	1	2	1	0	0	0	4,5	2	0	0	4,5	2	2	6	3	12	2	291	1	
	45	2	51	5	1	2	1	2	1	1	3	2	1	0	2,5	2	2	5	2	12	3	80	1	
	46	2	40	5	1	2	1	2	1	1	2	2	1	0	2,0	2	2	6	3	12	3	60	0	
47	1	48	5	1	2	1	0	0	0	4	2	0	0	2,0	2	2	5	2	0	3	291	1		
48	2	58	5	1	2	1	2	1	1	1,5	3	1	1	1,5	1	2	5	2	0	4	180	1		
49	1	74	5	1	2	1	0	0	0	0,9	2	0	0	1,5	2	2	6	3	0	4	104	1		
50	2	39	5	1	2	1	0	0	0	2,5	2	0	0	2,0	2	2	5	2	12	3	153	0		

Fortsetzung Tabelle A1: Erhobene Patientendaten

Einteilung	N	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Histologie Hauptdiagnose*1	Hauptdiagnose*2	Hauptdiagnose*3	Hauptdiagnose*4	LN-Metastasen*5	Fern-Metastasen*6	Fern-Metastasen*7	Tumorgröße in cm	T	N	M	Ki-67	Grading	MHC	Erkrankungsstadium**8	Erkrankungsstadium**9	EpCAM-Expression	Ki-67-Expression	Überleben (Monate)	verstorben = 0 überlebt = 1
Haupt-tumor	51	2	43	5	1	2	1	2	1	1	1,5	1	1	0	2,0	2	2	5	2	k.A.	k.A.	91	1
	52	2	35	5	1	2	1	0	0	0	2,8	1	0	0	1,0	2	2	5	2	12	3	152	0
	53	1	47	5	1	2	1	2	4	2	0,8	1	1	1	0,8	1	3	6	3	12	3	135	1
	54	1	54	4	2	3	2	3	3	5	6	4	1	1	2,5	2	3	6	4	3	0	158	1
	55	2	86	4	2	3	2	0	4;4a	2;5	3	4	1	1	4,0	2	2	2	1	12	0	90	0
	56	2	49	4	2	3	2	0	4;10	2;5	5	4	1	1	3,5	2	3	5	2	2	2	122	k.A.
	57	2	58	4	2	3	2	0	0	0	1,5	2	0	0	2,0	2	2	5	2	8	0	210	1
	58	2	31	6	3	4	2	0	0	0	1,5	2	0	0	2,5	2	2	5	2	8	0	174	1
	59	1	72	4	2	3	2	2	4	2	0,5	1	1	1	1,6	1	2	6	3	6	0	136	1
	60	2	64	4	2	3	2	0	0	0	2	2	0	0	4,0	2	2	6	3	12	0	3	0
	61	2	61	4	2	3	2	2	4	2	7	3	1	1	2,5	2	2	6	3	12	0	59	0
	62	2	52	4	2	3	2	0	4;8	2;5	6	2	0	1	5,0	2	2	2	1	12	0	90	1
	63	1	54	4	2	3	2	2	3	5	6	4	1	1	2,5	2	3	6	3	12	0	158	1
	64	1	26	4	2	3	2	2	4	2	3	4	1	1	2,5	2	3	6	3	8	0	89	1

65	2	43	3	1	2	1	3	7	5	1,7	1	2	1	3,0	2	2	6	3	12	2	144	0
66	1	30	3	1	2	1	0	0	0	1,2	1	1	0	0,5	1	1	1	1	k.A.	k.A.	124	1
67	1	46	2	1	2	1	0	0	0	2,5	2	0	0	3,0	2	3	5	2	0	2	144	0
68	1	56	4	2	3	2	2	4	2	5	4	1	1	6	2	3	6	3	12	0	186	1
69	2	46	7	1	5	3	0	0	0	3,5	1	0	0	2,0	1	1	1	1	12	0	192	0
70	2	19/10/61	4	2	3	2													12	0		
71	2	31	3	1	2	1	0	0	0	2,4	2	0	0	3,0	2	2	2	1	6	0	5	0
72	1	58	8	1	5	3	2	11a,b,c	5	4,5	4	1	1	7,0	2	3	5	2	12	0	94	0
73	1	59	7	1	5	3	0	0	0	3	2	0	0	2,0	2	2	2	2	3	2	17	0
74	1	77	9	1	5	3	0	4	2	1,5	2	1	1	1,50	1	3	6	3	12	0	158	0
75	2	47	3	1	2	1	1	0	0	4,5	3	0	0	4,5	2	1	3	2	12	0	151	1

Fortsetzung Tabelle A1: Erhobene Patientendaten

Einteilung	N	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Histologie Hauptdiagnose*1	Hauptdiagnose*2	Hauptdiagnose*3	Hauptdiagnose*4	LN-Metastasen*5	Fern-Metastasen*6	Fern-Metastasen*7	Tumorgroße in cm	T	N	N	Ki-67	Grading	WHO	Erkrankungsstadium**8	Erkrankungsstadium**9	EP-AM-Expression	Ki-67-Expression	Überleben (Monate)	verstorben = 0 überlebt = 1
Ha	76	1	35	3c	1	2	1	2	0	0	5,5	2	1	0	5,	2	2	5	2	k.A.	k.	118	0

u p t - t u m o r	77	2	46	6	3	4	2	1	1	1	0,8	1	0	0	0	1	1	1	1	0	A.	0	68	?
	78	2	54	10	2	5	3	0	0	0	0,8	1	0	0	2	1	1	1	1	0	3	47	0	
	79	1	44	8	1	5	3	2	4	2	7,2	2	1	1	3	2	2	5	2	6	6	78	?	
	80	1	73	6	3	4	2	2;	4	2	4	4	2	1	4	2	3	6	3	1	3	1	0	
	81	1	39	3d	1	2	1	0	4	2	4,5	2	0	1	4	2	2	6	3	8	2	89	1	
	82	2	58	2	1	1	3	2	0	0	5,5	2	1	0	3	2	3	5	2	3	0	k.	k.	A.
	83	1	22	10a	1	5	3	0	0	0	1,2	1	0	0	2	1	1	1	1	k.	k.	A.	72	?
	84	2	49	7	1	5	3	0	0	0	6,5	2	0	0	2	2	2	3	2	0	2	17	1	
	85	2	k.	7	1	5	3	0	0	0	1	1	0	0	2	1	1	1	1	1	2	0	k.	0
	86	1		4	2	3	2	2	0	0	2,5	3	1	1	2	2	1	5	2	1	2	0	11	1
	87	2	34	4	2	3	2	1	1	1	1,2	1	0	0	2	1	1	1	1	1	2	0	11	k.
	88	1	45	2	1	1	3	2	7	5	4,5	2	1	1	2	2	3	6	3	0	0	30	0	
	89	2	62	4	2	3	2	2	4	2	16	3	2	1	3	2	2	6	3	1	2	0	6	0
	90	1	54	4	2	3	2	2	3,4	2;	3,5	2	1	1	5	2	2	6	3	1	2	0	72	1
	91	1	69	4	2	3	2	0	0	0	3	2	0	0	3	2	2	1	1	0	3	76	1	
	92	1	66	4	2	3	2	0	4	2	2,2	3	0	1	2	2	2	6	3	8	0	62	1	
	93	1	37	6	3	4	2	2	0	0	3,5	2	1	0	2	2	2	5	2	1	2	2	43	1
	94	1	46	3	1	2	1	2;	4;	2;	1,8	1	1	1	4	2	3	6	3	1	2	0	15	0
	95	1	54	4	2	3	2	2	3,4	5	3,5	2	1	1	5	2	2	6	3	1	2	0	72	1
	96	2	46	6	3	4	2	2	4	2	3,5	3	1	1	4	0	2	6	3	4	0	10	k.	

Fortsetzung Tabelle A1: Erhobene Patientendaten

Einteilung	Id.	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Histologie Hauptdiagnose*1	Hauptdiagnose**2	Hauptdiagnose**3	Hauptdiagnose**4	LN-Metastasen*5	Fern-Metastasen*6	Fern-Metastasen*7	Tumorgröße in cm	T	N	N	Ki-67	Gra-ding	WHO	Erkrankungsstadium**8	Erkrankungsstadium**9	EPICAM-Expression	Ki-67-Expression	Überleben (Monate)	verstorben = 0 überlebt = 1
LKM etastasen	97	1	47	3d	1	2	1	0	4	2	6,2	2	0	1	6,2	2	1	3	2	6	2	108	0
	98	2	53	3	1	2	1	2	4	2	4	4	1	1	4,0	2	2	6	3	0	0	80	0
	99	1	58	3	1	2	1	2	1	1	1,5	1	1	1	1,5	1	3	6	3	0	2	8	0
	100	1	59	3	1	2	1	2	4	2	7	4	1	1	7,0	2	3	6	3	6	3	8	0
	101	2	66	3	1	2	1	2	4	2	3,5	3	1	1	5,0	2	2	6	3	12	0	59	0
	102	2	43	5	1	2	1	2	1	1	1,5	1	1	0	2,0	2	2	5	2	k.A.	k.A.	91	1
	103	1	72	4	2	3	2	2	4	2	0,5	1	1	1	1,6	1	2	6	3	6	0	136	1
	104	2	64	4	2	3	2	0	0	0	2	2	0	0	4,0	2	2	6	3	12	0	3	0
	105	1	26	4	2	3	2	2	4	2	3	4	1	1	2,5	2	3	6	3	8	0	133	1
	106	2	43	3	1	2	1	3	7	5	1,7	1	2	1	3,0	2	2	6	3	12	2	144	0
	107	2	62	4	2	3	2	2	4	2	16	3	2	1	3,0	2	2	6	3	12	0	6	0
	108	2	66	4	2	3	2	0	4	2	2,2	3	0	1	2,2	2	2	6	3	8	0	62	1
	109	1	39	3d	1	2	1	0	4	2	4,5	2	0	1	4,5	1	3	6	3	8	2	89	1
	110	1	37	6	3	4	2	2	0	0	3,5	2	1	0	2,5	2	2	5	2	12	2	432	1

111	1	54	4	2	3	2	2	3,4	5	3,5	2	1	1	5,0	2	2	6	3	12	0	72	1
103	1	72	4	2	3	2	2	4	2	0,5	1	1	1	1,6	1	2	6	3	6	0	136	1
104	2	64	4	2	3	2	0	0	0	2	2	0	0	4,0	2	2	6	3	12	0	3	0
105	1	26	4	2	3	2	2	4	2	3	4	1	1	2,5	2	3	6	3	8	0	133	1
106	2	43	3	1	2	1	3	7	5	1,7	1	2	1	3,0	2	2	6	3	12	2	144	0

Fortsetzung Tabelle A1: Erhobene Patientendaten

Einteilung	nd	Geschlecht	Alter bei Diagnose	Histologie Hauptdiagnose*1	Hauptdiagnose**2	Hauptdiagnose**3	Hauptdiagnose**4	LN-Metastasen*5	Fern-Metastasen*6	Fern-Metastasen*7	Tumorgroße in cm	T	N	N	Ki-67	Gra-ding	WHO	Erkrankungsstadium**8	Erkrankungsstadium**9	EpCAM-Expression	Ki-67-Expression	Überleben (Monate)	verstorben = 0 überlebt = 1
Lebermetastasen	112	1	62	3	1	2	1	2	4	2	10	3	1	1	10,0	2	2	6	3	12	1	80	0
	113	1	59	3	1	2	1	2	4	2	7	4	1	1	7,0	2	3	6	3	12	0	8	0
	114	2	66	3	1	2	1	2	4	2	3,5	3	1	1	5,0	2	2	6	3	0	0	59	0
	115	2	61	3	1	2	1	2	4	2	6,2	3	1	1	4,0	2	3	6	3	k.A.	3	15	0
	116	1	72	4	2	3	2	2	4	2	0,5	1	1	1	1,6	1	2	6	3	6	0	136	1
	117	1	26	4	2	3	2	2	4	2	3	4	1	1	2,5	2	3	6	3	8	0	113	1
	118	1	54	4	2	3	2	2	3,4	5	3,5	2	1	1	5,0	2	2	6	3	12	0	72	1
	119	1	54	4	2	3	2	2	3,4	5	3,5	2	1	1	5,0	2	2	6	3	12	0	72	1

	1 2 0	1	5 4	4	2	3	2	2	3, 4	5	3, 5	2	1	1	5 , 0	2	2	6	3	1 2	0	72	1
	1 2 1	1	5 4	4	2	3	2	2	3, 4	5	3, 5	2	1	1	5 , 0	2	2	6	3	1 2	0	72	1

\*1 1= NET Ösophagus, 2= NET Magen, 3= NET Pankreas, 3a= Insulinom, 3b= malignes Insulinom, 3c= Glukagonom, 3d= Vipom, 3e=PPom, 4= NET Dünndarm, 5= Gastrinom, 6= NET Dickdarm, 7=Thymus-Carcinoid, 7a=Thymom, 8=NET Lunge, 9=Inselzellkarzinom ohne endokrine Funktion, 10=Adenokarzinom, 10a=NNR-Adenom Somatostatinom

\*2 1 = foregut, 2 = midgut, 3 = hindgut

\*3 1= Ösophagus/Magen, 2 = Pankreas, 3 = Dünndarm, 4 = Dickdarm, 5 = andere

\*4 1 = Pankreas, 2 = Darm, 3 = andere

\*5 0= keine Angabe, 1= keine Metastase, 2 = regionale LK, 3 = periphere LK,

\*6 0= keine Angabe, 1= keine Metastase, 3= Mesenterium, 4= Leber, 4a=Milz, 5= Lunge, 6= Schilddrüse, 7= cerebrale Metastase, 8= ossäre Metastase, 9=Niere, 10=Peritoneum 11a=Pleura-Metastasen, 11b= Zwerchfellmetastasen, 11c=Perikard-Metastasen

\*7 0= keine Angabe, 1= keine Metastase, 2= Leber, 3= Lunge, 4= Peritoneum/Zwerchfell, 5= andere

\*8 1=I, 2=IIa, 3=IIb, 4=IIIa, 5=IIIb, 6=IV

\*9 1 = I-IIa, 2 = IIb-IIIb, 3 = IV

## • Danksagung

Ich möchte zum Ende meiner Arbeit die Gelegenheit nutzen, um mich ehrlich und vom ganzen Herzen bei allen zu bedanken, die mich tatkräftig bei meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Für die freundliche Aufnahme, Unterstützung und die intensive Betreuung im Labor danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Nikolas H. Stoecklein und seinem Team.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. Wolfram T. Knoefel, dem Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie, bedanken.

Herrn Prof. Dr. Stephan E. Baldus aus dem Institut für Pathologie danke ich für die freundliche Hilfe bei der Auswertung und Nachbegutachtung der Schnittpräparate sowie für das Überlassen von Tumormaterial und Tumordaten aus dem Universitätsklinikum Düsseldorf.

Meinem Betreuer Herrn PD Dr. med. Markus Krausch möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Mein letzter und ganz besonderer Dank gilt den Helden im Hintergrund, die mich immer wieder ermutigt haben, trotz etlicher Probleme, weiterzumachen,

meinen Eltern und meinen Pferden.

Ein besonders herzlicher Gruß geht an dieser Stelle an meine kleinen Germanen Alarich und Arminius, die mein Leben seit 2019 zum Positiven durcheinanderwirbeln.