

**Die Rolle des Chromosom 18 Verlustes für  
neuroendokrine Tumore des Ileums**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Brix, Joachim Alexander Stephan**

**2015**

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

Professor Dr. B. Sipos

Professor Dr. J. Bauer



## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

5-HIAA	5-Hydroxyindolylessigsäure
CDX2	Caudal-related homeobox 2
CEP	Chromosome enumeration probes
CgA	Chromogranin A
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DCC	Deleted in Colorectal Carcinoma
DPC4	Deleted in pancreatic carcinoma, locus 4
EC-Zellen	Enterochromaffine Zellen
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G-Zellen	Gastrin-bildende Zellen
GEP	Gastro-entero-pankreatisch
GI	Gastrointestinal
HE	Hämatoxylin-Eosin
HP	Hybridisierungspuffer
HPF	High Power Field
KI-67	Proliferationsmarker für histologische Beurteilung
L-Zellen	Glucagon like peptide 1 Zelle
LDCV	Large Dense Core Vesikel
Maspin	Mammary serine protease inhibitor
MEN1	Multiple endokrine Neoplasie 1
MIB-1	Proliferationsmarker für histologische Beurteilung
NaCi	Natriumcitrat
NEC	Neuroendocrine carcinoma / neuroendokrines Karzinom
NEN	Neuroendokrine Neoplasie
NET	Neuroendokriner Tumore
NSE	Neuronenspezifische Enolase
SEER	Surveillance, Epidemiology and End Results

SERPIN B5	Serine protease inhibitor B5
SSC	Saline-sodium citrate
SSV	Small synaptic Vesikel
TGF $\beta$	Transforming growth factor
TMA	Tissue microarray
TNM	Tumor/Nodes/Metastasis
VHL	Von Hippel-Lindau
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
WHO	World Health Organization

# Inhaltsverzeichnis

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen **IV**

## Inhaltsverzeichnis **VI**

### 1. EINLEITUNG

<b>1.1</b>	<b>NEUROENDOKRINE NEOPLASIEN DES GASTROINTESTINALTRAKTES</b>	<b>1</b>
1.1.1	EPIDEMIOLOGIE	2
1.1.2	KLASSIFIKATION	4
1.1.2.1	EINTEILUNG ANHAND DER LOKALISATION	4
1.1.2.2	WHO KLASSIFIKATION 2010	5
1.1.2.3	TNM EINTEILUNG	6
1.1.3	KLINIK	7
1.1.4	DIAGNOSTIK	9
1.1.5	PROGNOSE	10
<b>1.2</b>	<b>NEUROENDOKRINE TUMORE DES ILEUMS</b>	<b>14</b>
1.2.1	HISTOGENESE	14
1.2.2	HISTOLOGIE	14
1.2.3	KLINIK	15
1.2.4	DIAGNOSTIK	18
1.2.5	TUMORBIOLOGIE	19
1.2.6	TUMORGENETIK	20
1.2.6.1	CHROMOSOMALE ABERRATIONEN	20
1.2.6.2	TUMORSUPPRESSORGENE AUF CHROMOSOM 18	22
1.2.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	24

### 2. MATERIAL UND METHODEN

<b>2.1</b>	<b>GEWEBEPROBEN</b>	<b>25</b>
<b>2.2</b>	<b>HE FÄRBUNG</b>	<b>26</b>
<b>2.3</b>	<b>TISSUE-MICROARRAY (TMA)</b>	<b>26</b>
<b>2.4</b>	<b>IMMUNHISTOCHEMIE</b>	<b>27</b>
<b>2.5</b>	<b>FLUORESZENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (FISH)</b>	<b>28</b>
<b>2.6</b>	<b>DOPPELIMMUNFLUORESZENZ</b>	<b>30</b>

<b>3. ERGEBNISSE</b>	
3.1 HE FÄRBUNG	33
3.2 FLUORESCENZ-IN-SITU-HYBRIDISIERUNG (FISH)	34
3.3 IMMUNHISTOCHEMIE	36
3.4 DOPPELIMMUNFLUORESCENZ	39
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>40</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>44</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>46</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Neuroendokrine Neoplasien des Gastrointestinaltraktes

'Neuroendokrine Neoplasien des Gastrointestinaltraktes (GI-NENs)' ist die gemeinsame Bezeichnung für eine Vielzahl an Neoplasien, die sich bezüglich wesentlicher Merkmale wie Tumorbiologie, Klinik und Prognose teils erheblich voneinander unterscheiden [1].

Gemeinsam ist ihnen ihr Ursprung aus Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems, das sich aus neuroendokrinen Zellen zusammensetzt, die einzeln oder in kleinen Gruppen angeordnet, überall im Körper vorliegen, im GI-Trakt und dem Pankreas aber besonders häufig sind. Hier gibt es mindestens 17 verschiedene neuroendokrine Zelltypen die als möglicher Ursprung für die Tumorgenese fungieren können [2, 3].

Ein Kennzeichen dieser Zellen und der Tumore die aus ihnen hervorgehen ist die Fähigkeit bioaktive Peptide und Amine zu synthetisieren. Diese werden in „large-dense-core“ Vesikeln (LDCV) und „small-synaptic-like“ Vesikeln (SSV) gespeichert und stimulusabhängig freigesetzt, was zu charakteristischen Hypersekretionssyndromen führen kann. Ist das der Fall, spricht man von funktionell aktiven NENs. Abhängig von der Ursprungszelle des Tumors können eine Vielzahl verschiedener Substanzen gebildet und sezerniert werden. Diese sind für jede einzelne Tumorentität charakteristisch, weshalb sie als spezifische Tumormarker in der Diagnostik verwendet werden. Funktionell nicht aktive Tumore, die etwa 50% aller Fälle ausmachen, sind nicht mit Hypersekretionssyndromen assoziiert, weisen aber dennoch immunhistologisch und eventuell serologisch nachweisbare neuroendokrine Marker auf [2, 4].



### 1.1.1 Epidemiologie

Neuroendokrine Neoplasien des Gastrointestinaltraktes und des Pankreas gelten als seltene Neoplasien. Tatsächlich sind sie seltener als Adenokarzinome [1], machen aber dennoch etwa 2% aller Tumore des GI-Traktes aus [5] und sind im Dünndarm sogar die häufigste Tumorentität [6].

Bemerkenswert ist ein drastischer Anstieg der Inzidenz aller NEN in den letzten 3 Jahrzehnten. Untersuchungen des SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) Registers konnten in den USA einen signifikanten Anstieg der Inzidenz von 1973 (1,09/100.000) bis 2004 (5,25/100.000) zeigen [7] (Abbildung 1). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Studien aus Europa [6, 8, 9] und Japan [10].

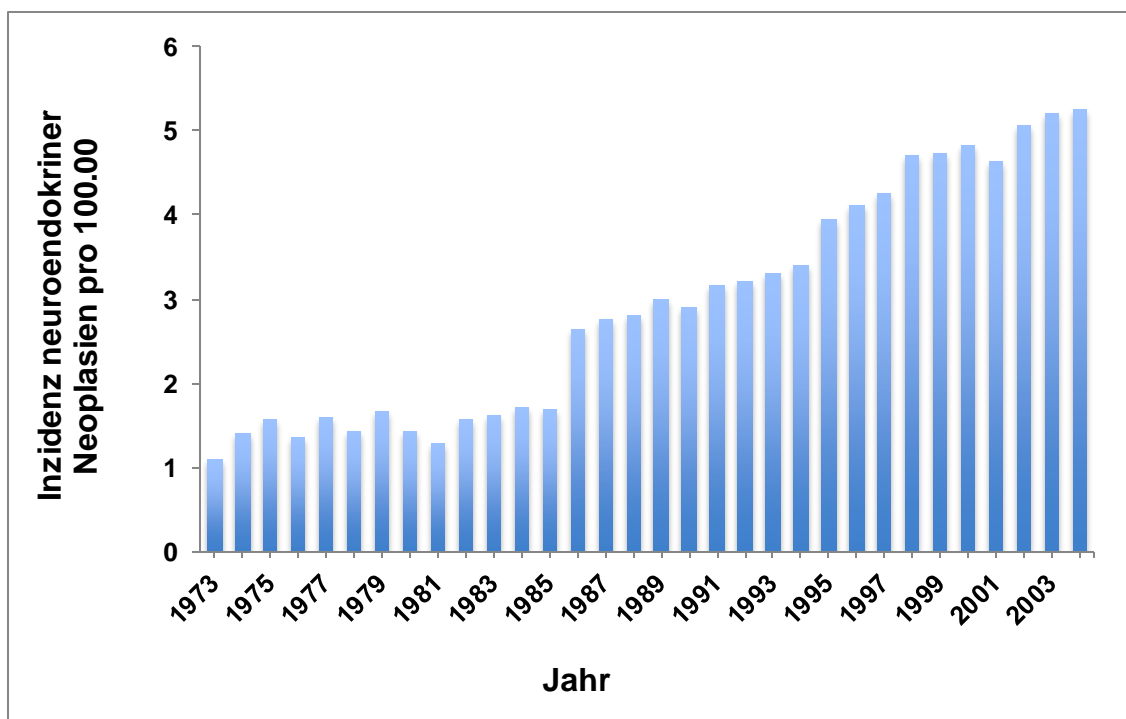


Abbildung 1: Entwicklung der Inzidenz neuroendokriner Neoplasien von 1973 bis 2004. (modifiziert nach [7])

Im gastroenteropankreatischen System sind vor allem die Inzidenzen von Neoplasien des Rektums und des Dünndarms angestiegen (Abbildung 2).

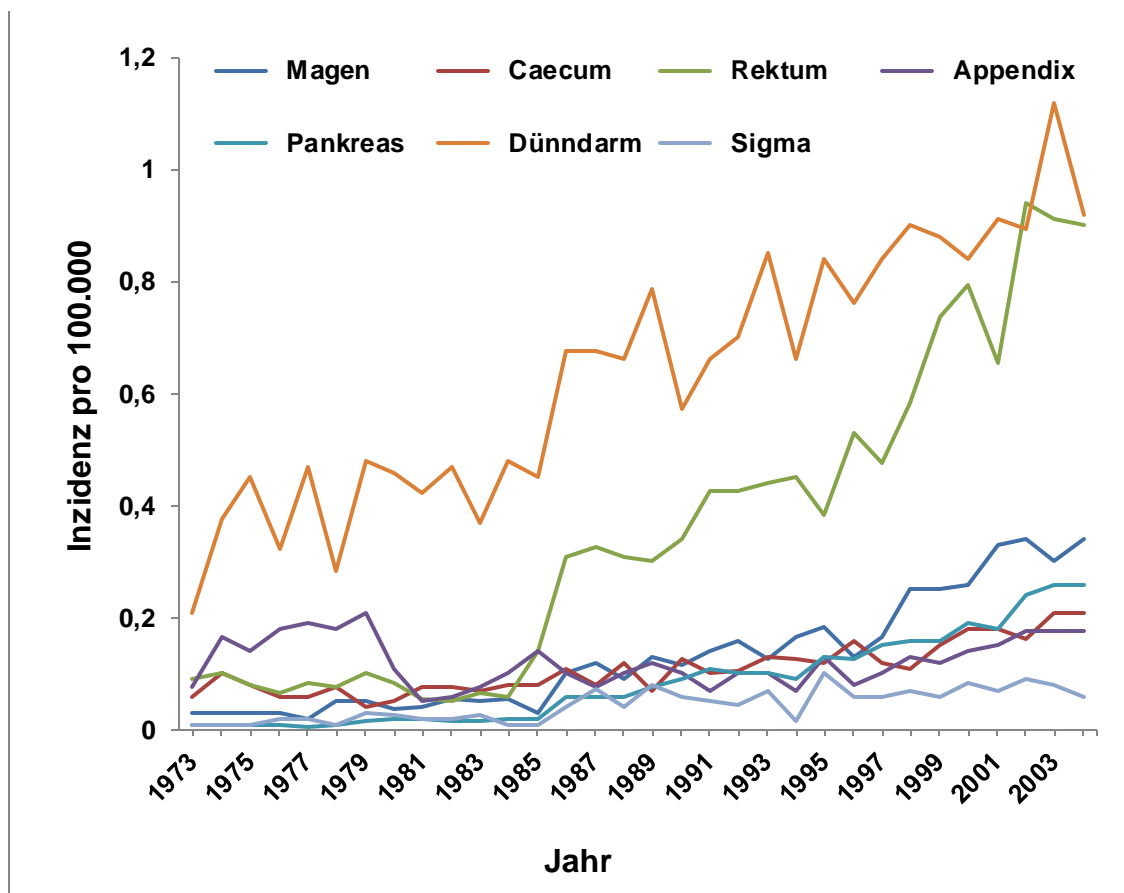


Abbildung 2: Entwicklung der Inzidenz neuroendokriner Neoplasien des Gastroenteropankreatischen Systems abhängig von der Lokalisation des Primärtumors. (modifiziert nach [1])

Über Ursachen für diesen beachtlichen Anstieg ist wenig bekannt. Es wird angenommen, dass ein steigendes Bewusstsein unter Ärzten und verbesserte diagnostische Möglichkeiten bezüglich endoskopischer und radiologischer Bildgebung, zu einem Großteil dafür verantwortlich sind. Außerdem werden die zunehmende Adipositas sowie Diabetes mellitus als auslösende Faktoren diskutiert [1, 11].

## **1.1.2 Klassifikation**

### **1.1.2.1 Einteilung anhand der Lokalisation**

Bezüglich ihres embryologischen Ursprungs werden GEP-NENs in Tumore des Vorderdarms, Mitteldarms und Enddarms unterteilt (Tabelle 1). In dieser Klassifikation wird allerdings nicht berücksichtigt, dass sich die einzelnen Tumore der jeweiligen Untergruppen bezüglich ihres biologischen Verhaltens zum Teil gravierend unterscheiden [12, 13].

**Tabelle 1:** Einteilung neuroendokriner Neoplasien nach Williams und Sander in Tumore des Vorder-, Mittel- und Enddarms mit den jeweils zugehörigen Lokalisationen. (nach [12])

<b>Ursprung</b>	<b>Lokalisation</b>
<b>Vorderdarm</b>	<b>Ösophagus</b>
	<b>Magen</b>
	<b>proximales Duodenum</b>
	<b>Leber</b>
	<b>Pankreas</b>
<b>Mitteldarm</b>	<b>distales Duodenum</b>
	<b>Jejunum</b>
	<b>Ileum</b>
	<b>Appendix</b>
	<b>Colon ascendens</b>
	<b>proximales Colon transversum</b>
<b>Enddarm</b>	<b>distales Colon transversum</b>
	<b>Colon descendens</b>
	<b>Sigma</b>
	<b>Rektum</b>

**1.1.2.2 WHO Klassifikation 2010**

Die WHO Klassifikation aus dem Jahr 2010 geht im Gegensatz zu früheren WHO Klassifikationen davon aus, dass sich alle NENs potentiell maligne verhalten können, sich aber in der Wahrscheinlichkeit Metastasen zu bilden unterscheiden [12, 14, 15].

Die Bezeichnung 'neuroendokrine Neoplasie' fungiert als Überbegriff für gut differenzierte neuroendokrine Tumore (NET) und schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome (NEC). NETs werden anhand ihrer proliferativen Aktivität weiter in NETs 1. Grades und NETs 2. Grades unterteilt. Die Proliferationsrate wird immunhistochemisch durch Bestimmung des Ki-67/MIB-1 Index oder durch auszählen der Mitosen bestimmt [14, 16] (Tabelle 2).

**Tabelle 2: WHO Klassifikation 2010 und vorgeschlagenes Grading-System.**  
Abkürzungen: HPF, high-power-field; NET, Neuroendokriner Tumor;  
NEC, neuroendokrines Karzinom. (modifiziert nach [15])

Klassifikation	Differenzierung	Grading		
		Grad	Mitosen (pro 10 HPF)	Ki-67 Index (%)
NET	gut differenziert	G1	< 2	≤2
NET	gut differenziert	G2	2-20	3-20
NEC	schlecht differenziert	G3	> 20	> 20

**1.1.2.3 TNM Einteilung**

Durch die European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) wurden 2006 und 2007 TNM Stadien für die verschiedenen GEP-NEN Entitäten vorgeschlagen [17, 18]. Im Jahr 2010 erschien darüber hinaus die 7. Auflage der „TNM Klassifikation maligner Tumoren“ der UICC (International Union Against Cancer). Die UICC-Klassifikation hat in der 7. Auflage den NEN ein eigenes Kapitel gewidmet. In der für diese Promotionsarbeit relevanten Gruppe der Tumoren des Ileums und Jejunums sind beide Klassifikationen identisch. Tabelle 3 zeigt die Klassifikation für NENs des distalen Jejunums und Ileums.

**Tabelle 3: ENETS TNM Stadien für neuroendokrine Neoplasien des distalen Jejunums und Ileums (links). Vorgeschlagene Stadieneinteilung abhängig vom TNM Stadium (rechts). (modifiziert nach [18])**

<b>TNM</b>		<b>Stadium</b>			
<b>T1</b>	≤1 cm, Tumor infiltriert Mukosa oder Submukosa	<b>Stadium I</b>	T1	N0	M0
<b>T2</b>	>1 cm oder Tumor infiltriert Muscularis propria	<b>Stadium IIa</b>	T2	N0	M0
<b>T3</b>	Tumor infiltriert Subserosa	<b>Stadium IIb</b>	T3	N0	M0
<b>T4</b>	Tumor perforiert das viscerale Peritoneum oder infiltriert andere Organe	<b>Stadium IIIa</b>	T4	N0	M0
		<b>Stadium IIIb</b>	Jedes T	N1	M0
<b>N0</b>	Keine regionären LK-Metastasen	<b>Stadium IV</b>	Jedes T	Jedes N	M1
<b>N1</b>	Regionäre LK-Metastasen				
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen				
<b>M1</b>	Fernmetastasen				

### 1.1.3 Klinik

Neuroendokrine Neoplasien des Gastrointestinaltraktes wachsen verglichen mit Adenokarzinomen meistens langsam. In der Regel sind die Primärtumore klein und klinische Symptome fehlen oder sind unspezifisch, was die Diagnosestellung vor allem bei nicht funktionell aktiven Tumoren häufig um mehrere Jahre verzögert. Funktionell aktive Tumore lösen durch hormonelle Hypersekretion charakteristische endokrine Syndrome aus.

Deshalb, und weil die gebildeten Sekretionsprodukte nachgewiesen und für diagnostische Zwecke genutzt werden können, werden funktionell aktive Tumore häufig früher entdeckt als ihre nicht funktionellen Konterparts. [12, 19].

Abhängig von der Tumorlokalisierung und den dort vorhandenen neuroendokrinen Zelltypen können verschiedene Hypersekretionssyndrome auftreten. Die häufigsten Syndrome sind mit ihren Leitsymptomen, den auslösenden Hormonen und der häufigsten Lokalisation des Primärtumors in Tabelle 4 dargestellt [4, 20].

**Tabelle 4:** Häufige Hormonhypersekretionssyndrome neuroendokriner Neoplasien mit den jeweiligen Leitsymptomen, den auslösenden Hormonen und der häufigsten Tumorlokalisierung. (modifiziert nach [4, 20])

Syndrom	Leitsymptome	Hormon	Lokalisation
<b>Karzinoidsyndrom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Flush</li> <li>• Diarrhö</li> <li>• abdominelle Schmerzen</li> <li>• Bronchokonstriktion</li> <li>• Endokardfibrose</li> </ul>	Serotonin	Ileum/Jejunum
<b>Insulinom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hyperinsulinämie</li> <li>• Hypoglykämie</li> </ul>	Insulin	Pankreas
<b>Gastrinom</b> (Zollinger-Ellison-Syndrom)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptische Ulzera</li> <li>• Diarrhö</li> </ul>	Gastrin	Pankreas und Duodenum
<b>Vipom</b> (Verner-Morrison-Syndrom)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diarrhö</li> <li>• Hypokaliämie</li> </ul>	VIP	Pankreas
<b>Glukagonom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diabetes mellitus</li> <li>• nekrolytisches migratorisches Erythem</li> </ul>	Glukagon	Pankreas
<b>Somatostatinom</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diabetes mellitus</li> <li>• Steatorrhö</li> <li>• Cholelithiasis</li> </ul>	Somatostatin	Pankreas und Duodenum

Funktionell inaktive Tumore werden nicht selten zufällig entdeckt. Klinische Symptome entwickeln sich erst spät und werden durch lokale Symptome aufgrund der TumorgroÙe oder durch bereits vorliegende Fernmetastasen ausgelöst. Metastasen entstehen hauptsächlich in der Leber, kommen aber auch in Lunge, Knochen und Gehirn vor [1, 2].

### **1.1.4 Diagnostik**

Die Diagnostik neuroendokriner Neoplasien basiert neben ihrem klinischen Erscheinungsbild auf bildgebenden Verfahren, Hormonuntersuchungen und histopathologischer Diagnostik.

Bei Tumormarkern unterscheidet man spezifische von unspezifischen. Spezifische Tumormarker sind spezifisch im Sinne einer Bestimmung der Zugehörigkeit einer NEN zu einer bestimmten Gruppe von NEN, indem sie die Sekretionsprodukte funktionell aktiver NENs oder deren Abbauprodukte nachweisen. Sie können sowohl im Serum als auch bei Gewebsuntersuchungen nachgewiesen und für die Diagnostik und Verlaufsbeobachtungen genutzt werden.

Neuroendokrine Marker sind vor allem für die histopathologische Diagnose einer NEN wichtig, da sie die entsprechende Zugehörigkeit einer Neoplasie zum diffusen neuroendokrinen System beweisen. Die wichtigsten neuroendokrinen Marker sind die vesikelassoziierten Marker Chromogranin A (CgA) und Synaptophysin.

CgA, ein Bestandteil der „small-synaptic-like“ Vesikel, ist bei NETs Grad 1 und Grad 2 regelmäßig erhöht. Allerdings weisen NECs Grad 3 häufig keine erhöhte CgA Expression auf.

Synaptophysin ist Teil der „large-dense-core“ Vesikel und im Gegensatz zu CgA wird Synaptophysin neben G1 und G2 Tumoren auch von neuroendokrinen Karzinomen Grad 3 immunhistochemisch intensiv exprimiert. Als Serummarker kommt Synaptophysin nicht zum Einsatz.

Neben Untersuchungen zum Nachweis neuroendokriner Markerproteinen sollte routinemäßig die proliferative Aktivität der Neoplasien durch auszählen der Mitosen oder mit Hilfe des Ki-67 Index bestimmt werden, da diese für den Patienten bezüglich Therapie und Prognose relevant ist [1, 12, 15, 21].



### **1.1.5 Prognose**

Neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems gelten im Vergleich zu Adenokarzinomen als relativ indolent verlaufende Erkrankung.

Für GEP-NENs liegen die 5-Jahres-Überlebensraten im Durchschnitt zwischen 50 % [9] und 77,5% [8].

Diese sind allerdings stark abhängig von prognostischen Faktoren wie Geschlecht, Alter bei Diagnosestellung, Differenzierung/Grading, Lokalisation des Primärtumors und Stadium der Erkrankung [7, 8].

#### Geschlecht

Weibliche Patienten hatten durchwegs längere mittlere Überlebenszeiten als männliche.

#### Alter bei Diagnosestellung

Diagnosestellung in höherem Alter (> 60 Jahre) ist mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert.

#### Differenzierung / Grading

Schlecht differenzierte NEN sind relativ selten, stellen aber eine prognostisch deutlich ungünstigere Gruppe dar als gut differenzierte.

#### Lokalisation des Primärtumors

Obwohl alle GEP-NENs laut aktueller WHO Klassifikation als potentiell maligne eingestuft werden, unterscheiden sich die einzelnen Tumorentitäten zum Teil gravierend bezüglich ihrer Dignität. So verhalten sich NENs der Appendix, des Rektums und des Magens eher benigne, während Neoplasien des Dünndarms, des Pankreas und des Kolons klinisch vorwiegend als maligne eingestuft werden. Abbildung 3 zeigt das biologische Verhalten neuroendokriner Neoplasien des gastroenteropankreatischen Systems abhängig von der Lokalisation des Primärtumors [22].

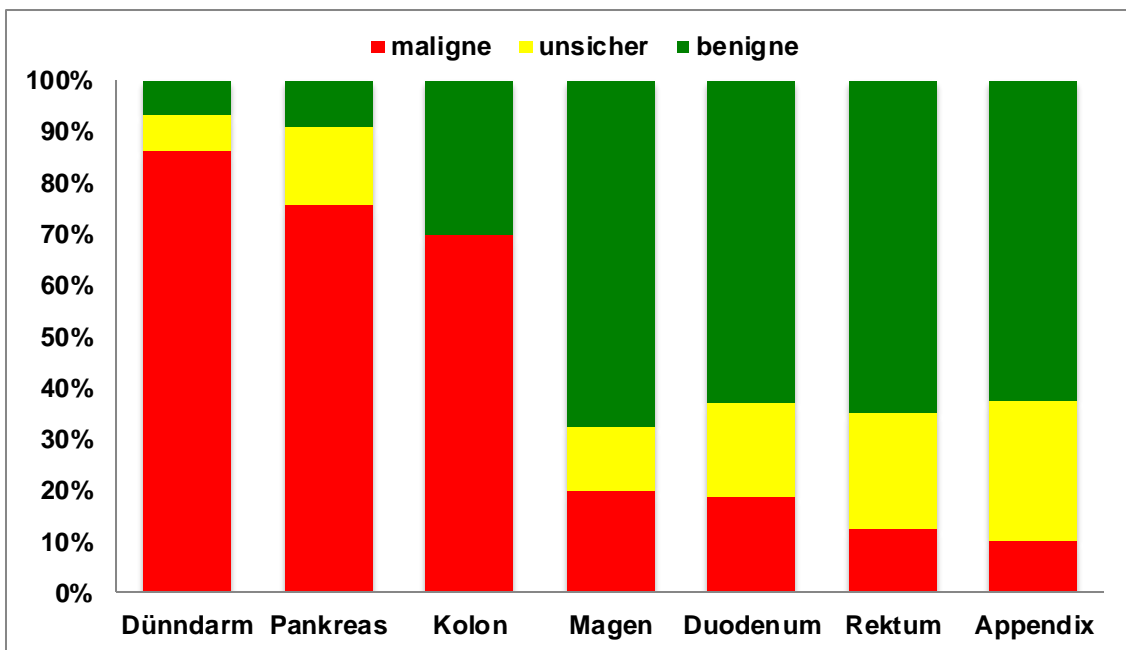


Abbildung 3: Biologisches Verhalten neuroendokriner Neoplasien in Abhängigkeit von der Lokalisation des Primärtumors in Prozent. (modifiziert nach [22])

### Stadium der Erkrankung

Nicht verwunderlich ist die Tatsache, dass das Stadium der Erkrankung prognostische Relevanz besitzt. Viele epidemiologische Studien unterscheiden ein lokalisiertes, ein regionales und ein fernmetastasiertes Stadium (Tabelle 5) [7], da zum Studienzeitpunkt kein einheitliches Staging System wie die von der ENETS vorgeschlagene Stadieneinteilung vorhanden war.

Tabelle 5: Stadieneinteilung neuroendokriner Tumore. (nach [7])

Stadium	Definition
<b>Lokalisiert</b>	Tumor ist auf das Ursprungsorgan begrenzt.
<b>Regional</b>	Tumor überschreitet Grenzen des Ursprungsorgans und/oder hat in regionäre Lymphknoten metastasiert.
<b>Fernmetastasiert</b>	Tumor hat Fernmetastasen gebildet.

Auffällig ist hier, dass Tumore unterschiedlicher Ursprungsorgane sich in ihrem zum Zeitpunkt der Diagnose vorliegendem Stadium stark unterscheiden. Lokalisierte Erkrankungen liegen häufiger bei Neoplasien des Rektums, des Duodenums, des Magens und der Appendix vor, während sich Tumore des Pankreas, des Kolons und des Dünndarms überwiegend bereits in regional fortgeschrittenen oder fernmetastasierten Stadien befinden (Abbildung 4). Durchschnittlich liegen in etwa 26% der Fälle aller NENs des gastroenteropankreatischen Systems zum Zeitpunkt der Diagnose Metastasen vor [2, 7].

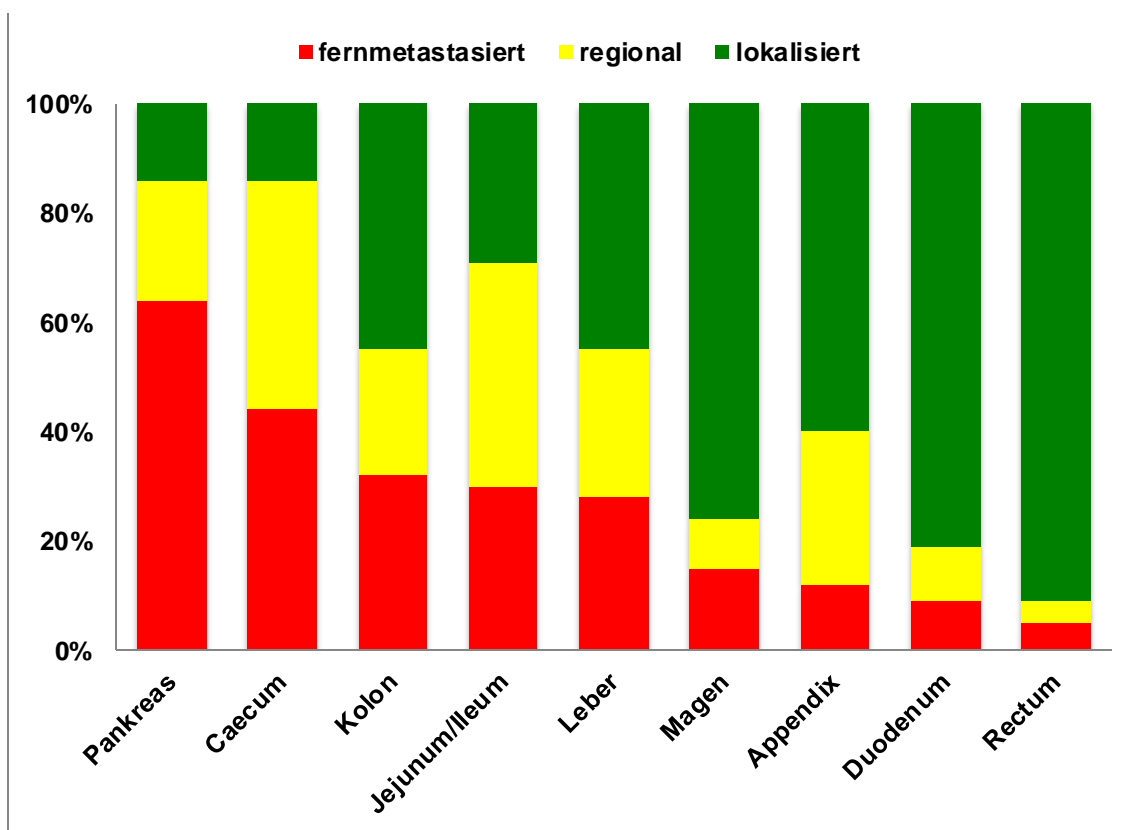


Abbildung 4: Stadium neuroendokriner Neoplasien bei Diagnosestellung in Abhängigkeit von der Lokalisation des Primärtumors in Prozent. (nach [7])

Auch die 5-Jahres-Überlebensraten der verschiedenen Tumorstadien sind abhängig vom Ursprungsort des Tumors [7] (Abbildung 5).

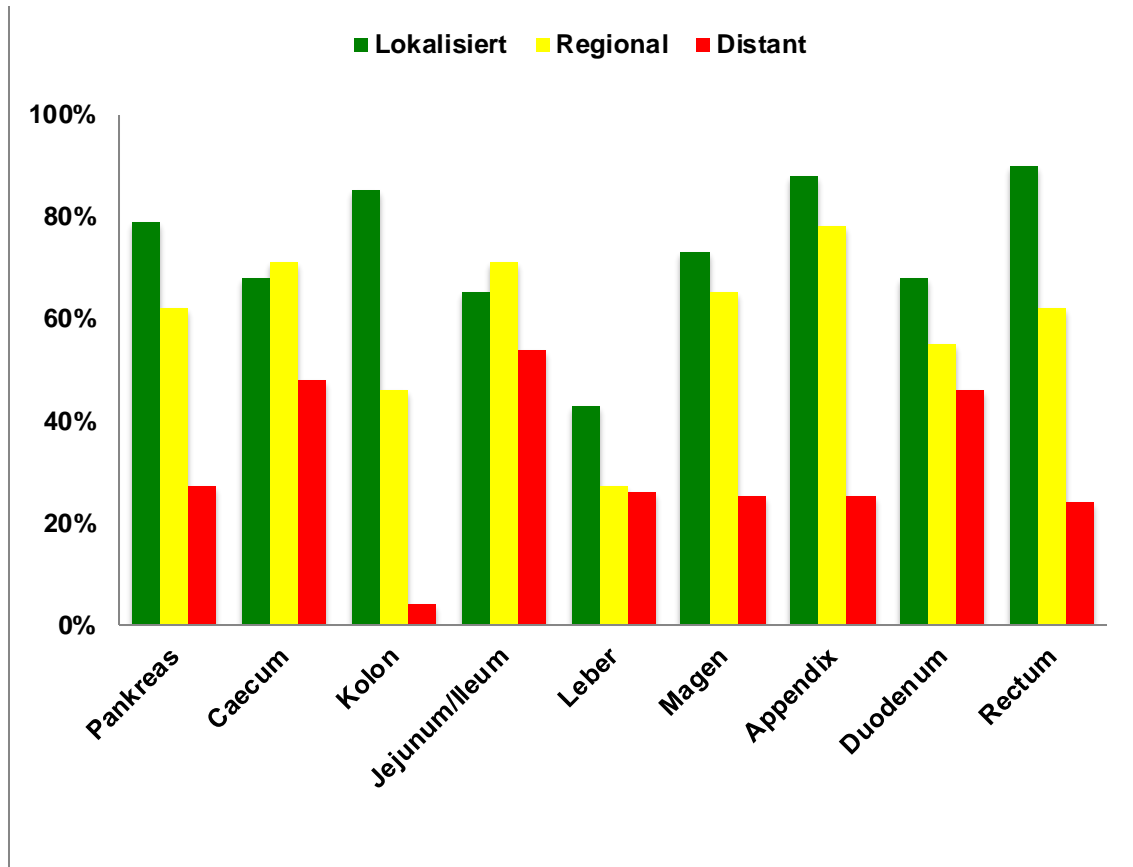


Abbildung 5: 5-Jahres-Überlebensrate neuroendokriner Neoplasien in Abhängigkeit vom Erkrankungsstadium und der Lokalisation des Primärtumors in Prozent. (nach [7])

## **1.2 Neuroendokrine Tumore des Ileums**

Im gastroenteropankreatischen System stellen NETs des Dünndarms neben Neoplasien des Rektums die häufigste neuroendokrine Tumorentität dar [7]. Innerhalb des Dünndarms entstehen NETs 7 mal häufiger im Ileum als im Duodenum und Jejunum [2]. Ileale NETs treten vorwiegend im terminalen Ileum nahe der Ileozäkalklappe und in 26 – 30% der Fälle multifokal auf. Makroskopisch präsentieren sie sich meist als ungestielte Knoten mit Durchmessern zwischen 1 und 2 cm, mit einer fest erscheinenden Schnittfläche und gelblicher Farbe [13, 23].

### **1.2.1 Histogenese**

Neuroendokrine Tumore des Ileums entwickeln sich zum größten Teil aus Enterochromaffinen Zellen (EC-Zellen). Selten auch aus G- und L- Zellen. Im Gastrointestinaltrakt sind EC-Zellen die häufigste neuroendokrine Zellentität. Sie produzieren verschiedene Hormone, unter anderem Serotonin, die an der physiologischen Regulation von Sekretion, Motilität, Blutfluss und viszeralem Schmerzempfinden beteiligt sind.

Die biologischen Vorgänge, die zur Entwicklung neuroendokriner Neoplasien führen sind noch weitgehend unbekannt. Man geht davon aus, dass sie sich aus speziellen Vorläuferzellen entwickeln, die in der Mukosa liegen und die für die Entstehung neuroendokriner Neoplasien benötigten Mutationen akkumulieren [2, 15].

### **1.2.2 Histologie**

Histologisch können EC-Zell-Tumore des Dünndarms verschiedene Wachstumsformen aufweisen. Typisch ist ein insuläres Wachstumsmuster aus Nestern oder Strängen dicht gepackter Zellen mit klar definierten Grenzen. Die Tumore bestehen aus monomorphen Zellen die häufig randständige Palisaden

bilden. Die kleinen, runden Zellkerne erscheinen ebenfalls sehr gleichförmig, haben wenige zytologischen Atypien und weisen niedrige Mitoseraten auf. Während vor allem kleine Läsionen meist von intakter Mukosa überzogen sind, haben fast alle Tumore die größer als 1 cm sind in die Tunica muscularis und häufig in die Subserosa infiltriert [13, 23-26].

### **1.2.3 Klinik**

Neben klinischen Symptomen die durch lokales Wachstum des Primarius verursacht werden (z.B. Blutung, Obstruktion und palpable Tumormassen), können auch ileale NETs Hormonhypersekretionssyndrome auslösen. Da neuroendokrine Tumore des Ileums überwiegend aus EC Zellen entstehen und meist eine gute neuroendokrine Differenzierung behalten, sind sie in der Lage große Mengen an Serotonin zu speichern und freizusetzen, was im klinischen Verlauf, zu verschiedenen Symptomen führen kann, die zusammen als Karzinoidsyndrom bezeichnet werden [5, 14].

Abbildung 6 gibt einen Überblick über Symptome die durch neuroendokrine Tumore des Dünndarms ausgelöst werden und deren Häufigkeit [27].

Das klassische Karzinoidsyndrom ist relativ selten (18% aller Patienten mit EC-Zell-Tumoren des Jejunums/Ileums) und tritt meist erst auf wenn sich bereits Lebermetastasen entwickelt haben (95%) [1, 13]. In der Regel sind Metastasen neuroendokriner Tumore des Ileums größer als die Primärtumore. Deshalb sind sie in der Lage größere Mengen an Serotonin zu produzieren und zu sezernieren. Außerdem wird bei vorhandenen Lebermetastasen der metabolische Abbau in der Leber umgangen und größere Mengen können in den systemischen Kreislauf gelangen (Abbildung 7) [28].

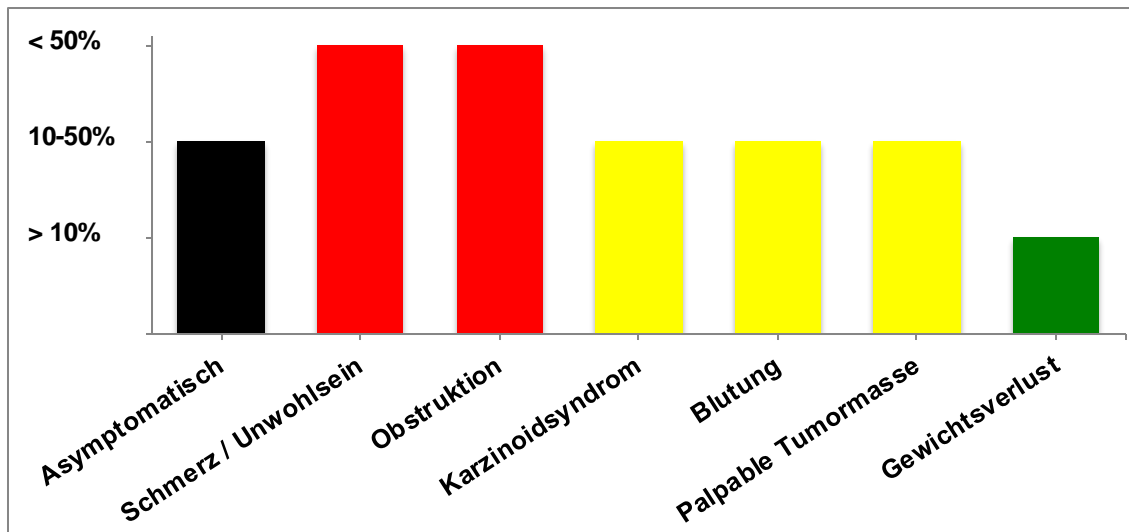


Abbildung 6: Überblick über Symptome neuroendokriner Tumore des Ileums und deren Häufigkeit. (modifiziert nach [27])

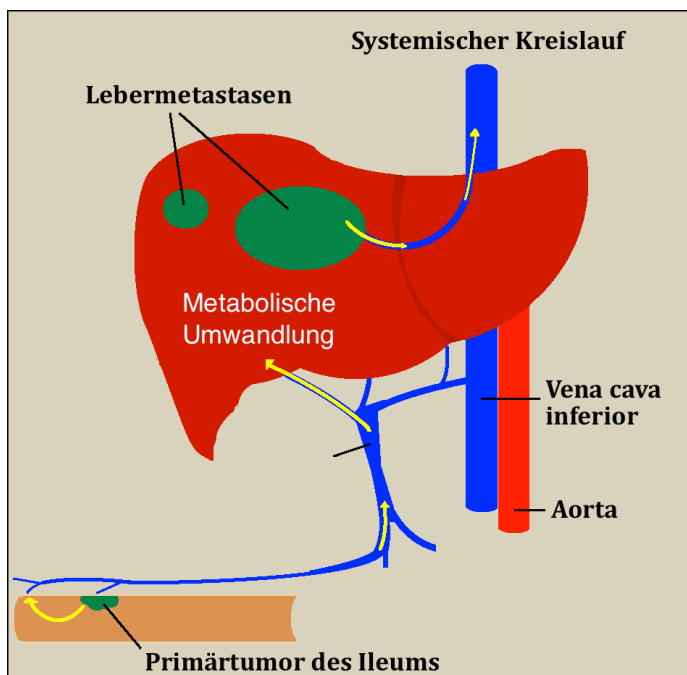
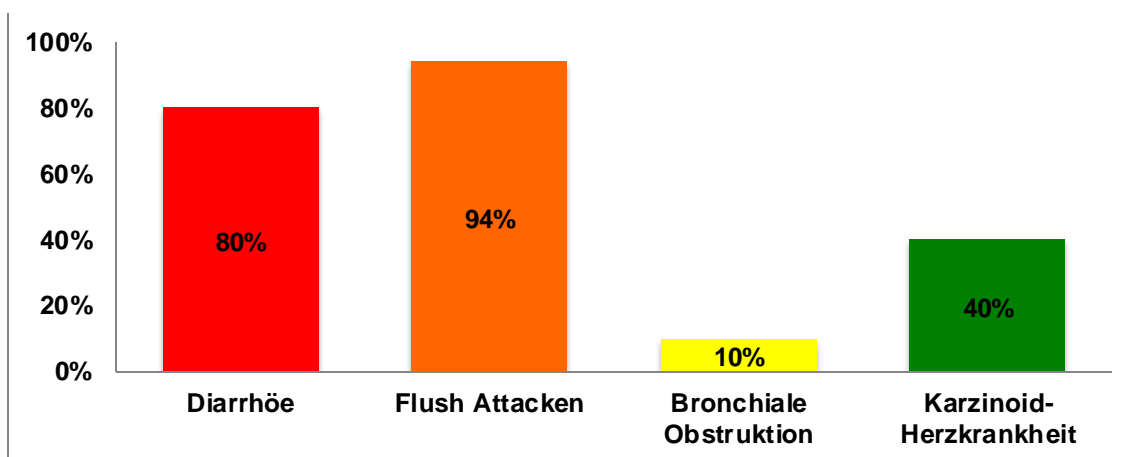


Abbildung 7: Pathophysiologie des Karzinoidsyndroms bei vorhandenen Lebermetastasen. (modifiziert nach [28])

Das klassische Karzinoidsyndrom besteht aus chronischer Diarrhöe, Flush-Attacken, intermittierender bronchialer Obstruktion und als Spätfolge einer Funktionseinschränkung des rechten Herzens durch Sklerosierung der Segel und konsekutiver Trikuspidalinsuffizienz, die 'Karzinoid-Herzkrankheit' genannt wird.

Abbildung 8 gibt einen Überblick über die Häufigkeit der einzelnen Symptome des Karzinoidsyndroms [14, 29].



**Abbildung 8:** Überblick über Symptome des Karzinoidsyndroms und deren Häufigkeit in Prozent. (nach [29])



### **1.2.4 Diagnostik**

Neben dem Nachweis allgemeiner neuroendokriner Marker können vor allem Untersuchungen zum Nachweis von Serotonin oder dessen Abbauprodukten die Diagnose eines EC-Zell Tumors erleichtern.

Im 24 Stunden Urin kann 5-Hydroxyindolylessigsäure (5-HIAA), ein Stoffwechselprodukt des Serotonins das im Urin ausgeschieden wird, bestimmt werden.

Serotonin, das in neurosekretorischen Vesikeln vorliegt, kann mittels immunhistochemischer Färbungen des Tumorgewebes auch direkt nachgewiesen werden [13, 21].

Der Transkriptionsfaktor CDX2 kann bei vorhandenen Metastasen und unklarer Lokalisation des Primärtumors als Marker für einen Ursprung des Tumors im Mitteldarm genutzt werden. CDX2 wird von neuroendokrinen Tumoren die hier ihren Ursprung haben stark exprimiert, während Neoplasien des Vorderdarms nur minimale und Läsionen des Enddarms keine Expression von CDX2 zeigen [21, 30].

### **1.2.5 Tumorbiologie**

Neuroendokrine Tumore des Ileums entstehen fast ausschließlich aus EC-Zellen, sind gut differenziert und wachsen langsam. Die proliferative Aktivität ist mit einem in der Mehrzahl der Fälle unter 1% liegenden Ki67-Index gering. Dennoch wachsen diese Neoplasien häufig lokal aggressiv und neigen zu einer frühzeitigen Metastasierung. Zum Zeitpunkt der Diagnose liegen bei NETs des Dünndarms in etwa 60% der Fälle Metastasen vor. Der Durchschnitt aller GEP-NETs beträgt 26% [2, 31].

Ob bereits eine Tumorausssaat in Lymphknoten oder die Leber stattgefunden hat, ist bei ilealen Tumoren abhängig von der Größe des Primärtumors. Liegt die Tumorgöße unter 0,5 cm sind Metastasen selten. Ab einem Durchmesser von 1 cm liegen in 30% der Fälle Lymphknotenmetastasen vor, bei Läsionen ab einer Größe von 2 cm sogar in 100% [14].

Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 68,1%. Liegt eine hepatische Metastasierung vor, sinkt sie auf 18-32%. Die relativ schlechte Prognose neuroendokriner Tumore des Dünndarms spiegelt sowohl die maligne Natur dieser Neoplasien, als auch die diagnostischen Schwierigkeiten von Läsionen im Dünndarm verglichen mit anderen Primärtumorlokalisationen wieder [2].

Gerade Tumore die kein Karzinoidsyndrom auslösen werden häufig zufällig entdeckt. Leider kommt es nicht selten vor, dass die Diagnose erst auf der Suche nach einem Primarius bei vorhandenen Lebermetastasen oder bei Komplikationen lokal fortgeschrittener Krankheitsstadien wie einem Subileus gestellt wird [14].

## **1.2.6 Tumorgenetik**

Neuroendokrine Neoplasien des gastroenteropankreatischen Systems entstehen größtenteils sporadisch (> 95%). Allerdings können manche, vor allem Pankreastumore, im Rahmen hereditärer Tumorsyndrome wie Multipler endokriner Neoplasie 1 (MEN1) oder von Hippel-Lindau-Syndrom (VHL) vorkommen. Läsionen des Ileums sind nicht mit hereditären Tumorsyndromen assoziiert, neuroendokrine Erkrankungen in der Familie scheinen aber das Erkrankungsrisiko zu erhöhen [2, 14].

### **1.2.6.1 Chromosomale Aberrationen**

Genetische Untersuchungen neuroendokriner Neoplasien des Ileums konnten eine Vielzahl an chromosomalen Veränderungen, die möglicherweise in der Pathogenese dieser Läsionen involviert sind, identifizieren [32-42]. Einen Überblick der chromosomalen Aberrationen neuroendokriner Tumore des Ileums ist in Abbildung 9 dargestellt.

Genetische Veränderungen sind vor allem auf Chromosom 18 konzentriert. Verluste des ganzen Chromosoms oder des langen Arms wurden in bis zu 88% der untersuchten Tumore gefunden. Da diese Veränderungen sowohl in Primärtumoren, als auch in Metastasen vorhanden sind, scheinen Verluste auf Chromosom 18 ein frühes Ereignis in der Tumorgenese zu sein [2, 43, 44].

Neben Verlusten auf Chromosom 18 wurden chromosomale Verluste vor allem auf den Chromosomen 3, 9, 11, 12, 13 und 16 gefunden. Zugewinne wurden hauptsächlich auf den Chromosomen 4, 5, 7, 10, 14, 17 und 20 beschrieben [32-42].

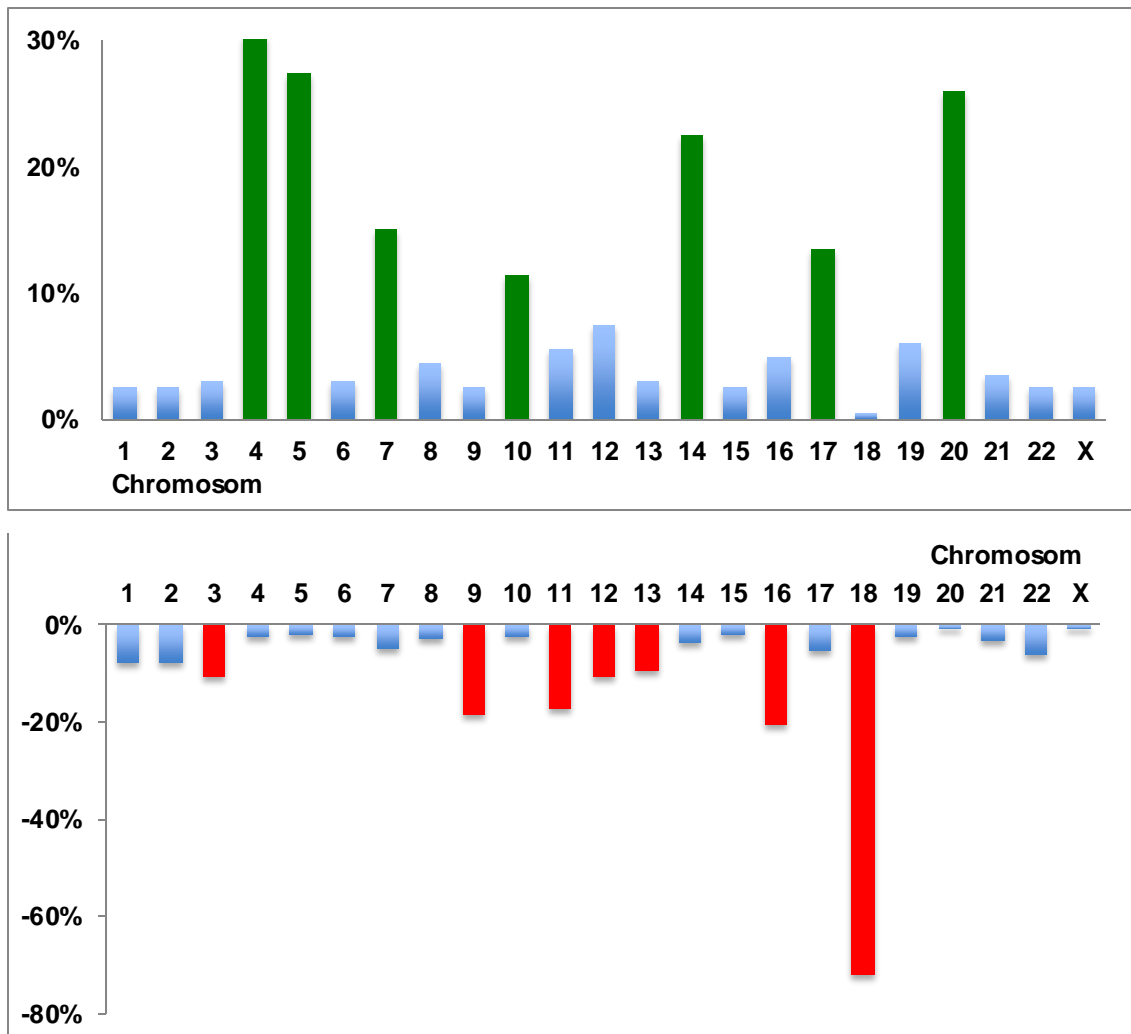
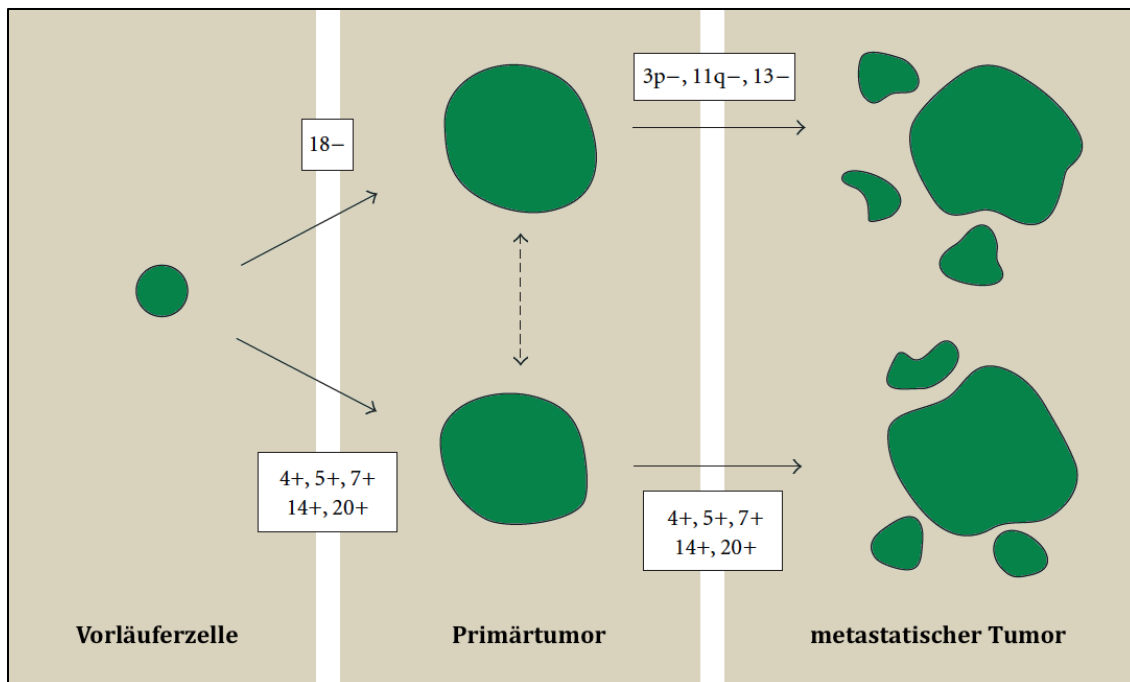


Abbildung 9: Chromosomale Veränderungen neuroendokriner Tumore des Ileums. Zugewinne der Chromosomen 4,5,7,10,14,17 und 19 wurden am häufigsten gefunden (oben). Verluste wurden am häufigsten für die Chromosomen 3,9,11,12,13,16 und 18 entdeckt (unten). (modifiziert nach [32-42])

Tumore mit intaktem Chromosom 18 zeigen im Gegensatz zu Fällen mit Verlusten auf diesem Chromosom überdurchschnittlich häufig Zugewinne ganzer Chromosome. Diese betreffen vor allem die Chromosome 4,5,7,10,14 und 20. Einige Autoren gehen deshalb davon aus, dass neuroendokrine Tumore des Ileums auf zwei unterschiedlichen Wegen entstehen können.

Die größere Gruppe ist durch Verluste von Chromosom 18 charakterisiert (65-75%). In ihrem Tumorprogress zum metastatischen Tumor kommt es zu weiteren Veränderungen, insbesondere zu Verlusten von Chromosom 3p, 11q und 13.

Gruppierte Zugewinne der Chromosomen 4,5,7,17 und 20 charakterisieren eine kleinere Gruppe von Neoplasien. Diese besitzen häufig keine Veränderungen von Chromosom 18 (Abbildung 10) [33, 34, 45].



**Abbildung 10: Chromosomale Veränderungen in der Tumorgenese neuroendokriner Tumore des Ileums. (nach [45])**

### **1.2.6.2 Tumorsuppressorgene auf Chromosom 18**

Die Tatsache, dass neuroendokrine Tumore des Ileums häufig chromosomale Veränderungen auf Chromosom 18 aufweisen, spricht für eine Beteiligung der Gene die auf diesem Chromosom lokalisiert sind in der Tumorgenese. Die bekannten Tumorsuppressorgene auf Chromosom 18 sind DCC, Smad2, Smad4/DPC4 und SERPINB5/Maspin.

Das DCC (deleted in colorectal Cancer) Gen (18q21.3) kodiert für einen Netrin-1 Rezeptor und ist an der Regulation von Zell Migration und Apoptose beteiligt. Wie der Name besagt, wird DCC in kolorektalen Karzinomen aber auch in Neoplasien des Pankreas vermindert exprimiert [46-48].

Smad2 (18q21.1) und Smad4/DPC4 (18q21.1) sind an der Funktion von TGF $\beta$  beteiligt und somit in Form von Tumorsuppressorgen an der Regulation von Zell Proliferation, Differenzierung, Wachstum und Apoptose beteiligt [49, 50].

SerpinB5/Maspin (18q21.3) ist ein Tumorsuppressorgen und gehört zur Familie der Serpine. Es spielt in der Tumorgenese verschiedener Neoplasien, vor allem aber bei Tumoren der Mamma und der Prostata, eine Rolle indem es an der Regulation von Zellwachstum, Zellmigration, Zelladhäsion und der Angiogenese beteiligt ist [51, 52].

### 1.2.7 Zielsetzung der Arbeit

Da neuroendokrine Tumore des Ileums trotz steigender Inzidenz eine relativ seltene Erkrankung darstellen, sind in Studien, die pathogenetische Mechanismen die zur Tumorentstehung beitragen untersuchen, die Fallzahlen häufig gering. Für unsere Untersuchungen versuchten wir deshalb mittels Datenbankrecherchen an den pathologischen Instituten der Universitätskliniken Tübingen, München, Düsseldorf und Marburg eine möglichst große Anzahl von NETs des Ileums zu identifizieren, um fundierte Untersuchungsergebnissen zu erhalten.

Um Verluste von Chromosom 18 in ilealen NETs nachweisen, beziehungsweise Ergebnisse die bereits in der Literatur beschrieben wurden an einer großen Kohorte verifizieren zu können, wurden in der hier vorliegenden Arbeit Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen an Gewebsschnitte neuroendokriner Tumore des Ileums durchgeführt und diese mikroskopisch ausgewertet.

Um Aussagen über den Zeitpunkt dieser Veränderung machen zu können, wurden die Tumore mittels TNM Klassifikation in drei Kohorten (Kohorte 1: T1-3, N0, M0; Kohorte 2: T1-4, N1, M0; Kohorte 3: T1-4, N1, M1) unterteilt und die Ergebnisse einzeln betrachtet.

Außerdem wurden mittels immunhistochemischer Färbungen die auf Chromosom 18 bekannten Tumorsuppressorgene (DCC, Smad2, Smad4/DPC4 und Maspin/SerpinB5) untersucht, um eine Aussage über deren Beteiligung an der Entstehung neuroendokriner Tumore des Ileums machen zu können.

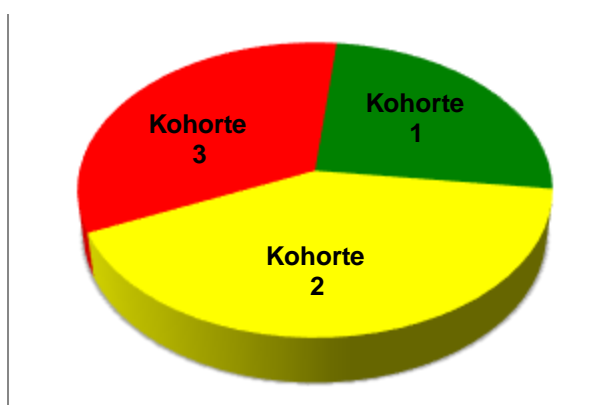
## 2. Material und Methoden

### 2.1 Gewebeproben

Formalinfixierte Gewebeproben der Primärtumore neuroendokriner Tumore des Mitteldarms und das auf den Tumorblöcken vorhandene Normalgewebe von 87 Patienten wurden untersucht. Die Proben stammten aus den Instituten für Pathologie der Universitätskliniken Tübingen, München, Düsseldorf und Marburg. Die Proben wurden bezüglich ihrer TNM Stadien in drei Kohorten unterteilt (Tabelle 6).

Tabelle 5: Kohorteneinteilung anhand des TNM Stadiums mit der jeweiligen Fallzahl

Kohorte	TNM	Anzahl der Fälle
1	• T1-T3 • N0 • M0	22
2	• Jedes T • N1 • M0	36
3	• Jedes T • Jedes N • M1	29



Bei Fällen der Kohorte 1 wurden durchschnittlich acht Lymphknoten auf eine Tumorausssaat überprüft. Allerdings wurden auf Grund der inzidentellen Funde der NETs in neun der 22 Fälle keine Lymphknoten entfernt und dementsprechend nicht histologisch untersucht.



## 2.2 HE Färbung

Aus den formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben der neuroendokrinen Tumore wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger aufgebracht und die Zellkerne mit Hämatoxylin, das Zytoplasma mit Eosin angefärbt.

Anschließend wurde auf den HE-gefärbten Präparaten das Tumorareal markiert um die Diagnose zu bestätigen und markierte Tumorareale für die TMA Konstruktion und die Auswertung der FISH Untersuchungen zu haben.

## 2.3 Tissue-Microarray (TMA)

Unter Verwendung eines halbautomatischen Tissue Arrayer (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA) wurden aus dem Tumorareal der Donor Blöcke jeweils zwei Stanzzyylinder (1mm Ø) entnommen und in einen Recipient Block eingebracht (Abbildung 11). Von diesem wurden 3,5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost-Objektträger aufgebracht.

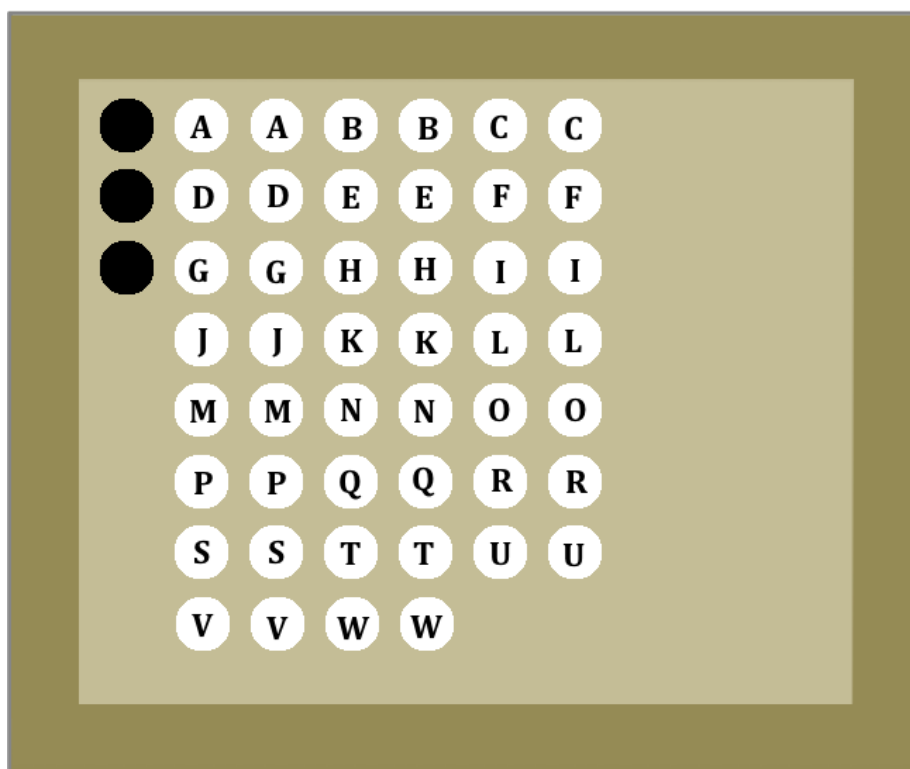


Abbildung 11: Schematische Darstellung eines TMA; • Orientierungspunkt, A-W Stanzzyylinder

## 2.4 Immunhistochemie

Die 3,5  $\mu\text{m}$  dicken und auf Superfrost-Objektträger aufgezogenen Gewebeschnitte der neuroendokrinen Tumore wurden entparaffiniert. Die Schnitte für die immunhistochemischen Färbungen von DCC und Smad2 wurden in Citrat-Puffer pH6 hitzevorbehandelt und 30 Minuten mit Goat-Serum (Gibco, #16210) geblockt. Die Antikörper Inkubation erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die Detektion mit *ultraView* Universal Detektion Kit (Ventana, # 760-500) im automatischen Färbesystem Ventana Benchmark (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) durchgeführt.

Tumorschnitte für den Nachweis von Smad4 wurden in TEC-Puffer pH9 und für Maspin in Citrat-Puffer pH6 hitzevorbehandelt und anschließend mit der halbautomatischen Färbestation Tecan Genesis RSP 100 (Tecan Trading AG, Schweiz) unter Verwendung des Polymersystems Zytochem-Plus HRP Polymer-Kit (Zytomed, Berlin, Deutschland, # POLHRP-100) und dem DAB Substrate Kit (Zytomed, # DAB530) gefärbt.

Die verwendeten Antikörper waren Anti-DCC antibody [DM51] (DCC), Smad2 (YZ-13): sc-101153 (Smad2), Smad4 (B-8): sc-7966 (Smad4) und Purified Mouse Anti-Human Maspin (Maspin). Zur Verdünnung der Antikörper für DCC und Smad2 wurde der Antibody Diluent # 251-018 von Ventana verwendet, für Smad4 und Maspin der Antibody Diluent # ZUC025 von Zytomed.

Details zu den verwendeten Antikörpern sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 6: Eigenschaften der Antikörper die für die immunhistochemische Färbung zum Nachweis von DCC, Smad2, Smad4 und Maspin verwendet wurden.

Antigen	Klon	Typ - Quelle	Hersteller	Verdünnung
<b>DCC</b>	DM51	Monoklonal - Maus	Abcam, Cambridge, UK # 49169	1:100
<b>Smad2</b>	YZ-13	Monoklonal - Maus	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA #101153	1:10
<b>Smad4</b>	B-8	Monoklonal - Maus	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA # 7966	1:100
<b>Maspin</b>	G167-70	Monoklonal - Maus	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland # 554292	1:1000

Die Auswertung der gefärbten Slides erfolgte lichtmikroskopisch. Dabei wurde zunächst die Färbe- und Schnittqualität überprüft und anschließend die Expression von DCC, Smad2, Smad4 und Maspin unter Verwendung des auf dem Schnitt vorhandenen Normalgewebes als Positivkontrolle beurteilt. Bei ungenügender Färbe- beziehungsweise Schnittqualität, oder bei fehlender Expression der untersuchten Antigene im Tumor wurde die Färbung mit gegebenenfalls höherer Antikörperkonzentration wiederholt.

## 2.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Für den Nachweis von Chromosom 18 Verlusten wurde eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der Tumore durchgeführt und die Ergebnisse mikroskopisch ausgewertet. Hierfür wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert. Anschließend erfolgte die Hitzebehandlung in NaCl und der enzymatische Verdau der Proteine durch Pepsin um die Ziel-DNA für die Sonde zugänglich zu machen. Vor der Hybridisierung erfolgte noch die Denaturierung der DNA in 70% FA/2xSSC Lösung (Formamid/saline-sodium citrate Puffer) bei 72°C.

Die Hybridisierung erfolgte im ThermoBrite (Abbott Molecular Inc., IL, USA). Die verwendete Sonde war eine CEP (Centromeric Enumeration Probe) 18 Sonde der Firma Abbott Molecular (Abbott; CEP 18 (D18Z1) SpectrumGreen Probe; # 05J10-028), die in der Zentromerregion von Chromosom 18 bindet (18p11.1-q11.1) (Abbildung 12). Die Verdünnung der Sonde erfolgte mit CEP Hybridisierungspuffer (CEP HP) (Abbott; # 07J36-001) und destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) im Verhältnis 1 : 2 : 7 (Sonde : dH<sub>2</sub>O : CEP HP). Nach der Hybridisierung wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt.

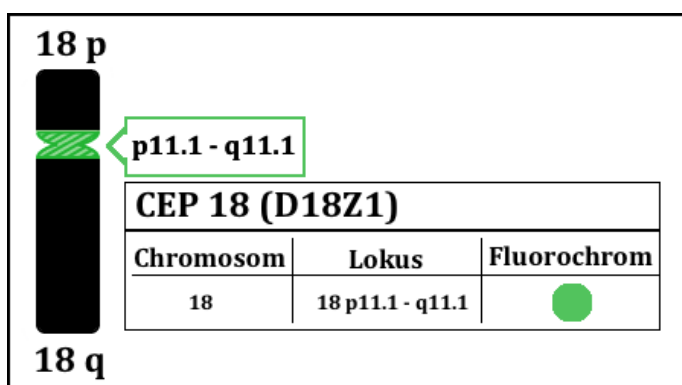


Abbildung 12: Eigenschaften der für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung verwendeten Sonde. (nach <http://www.abbottmolecular.com/chromosome/18.html> (01.02.2013))

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch bei 630-facher Vergrößerung mit Immersionsöl unter einem Zeiss Axioskop (Zeiss, Jena, Deutschland). Die verwendeten Filter sind in Tabelle 8 dargestellt.

Beurteilt wurde die Signalanzahl (1 Signal: Verlust von Chromosom 18; 2 Signale: kein Verlust) in einzelnen Zellen des Tumorareals in mindestens 100 Zellen pro Fall.

Neben den klassischen Gewebeschnitten wurden in 68 der 87 Fälle Tissue-Microarrays der Tumore untersucht, um nachzuweisen, dass beide Methoden zu identischen Ergebnissen führen und so die Auswertung von Chromosom 18 Verlusten mittels FISH auf TMAs zu etablieren.

Tabelle 7: Eigenschaften der für die FISH Auswertung verwendeten Filter

Filter	Anregung	Strahlteiler	Emission
DAPI-Filter (blau) Filtersatz 49	G 365	FT 395	BP 445/50
eGFP-Filter (grün) Filtersatz 38HE	470/40 (HE)	FT 495 (HE)	BP 525/50 (HE)

## 2.6 Doppelimmunfluoreszenz

Zum Nachweis von Maspin in neuroendokrinen Zellen der ilealen Mukosa wurde eine Doppelimmunfluoreszenzfärbung von Synaptophysin (als Marker für neuroendokrine Zellen) und Maspin durchgeführt. Es wurden 20 der 87 vorhandenen Gewebeschnitte verwendet. Diese wurden anhand der HE-gefärbten Präparate bezüglich der Menge an vorhandenem Normalgewebe ausgewählt.

Nach der Entparaffinierung der Schnitte erfolgte die Hitzevorbehandlung mit Citratpuffer pH 6. Anschließend erfolgte zunächst die Detektion von Maspin. Als Primärantikörper wurde Purified Mouse Anti-Human Maspin (Klon G167-70; monoklonal-Maus; Verdünnung 1:500; BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland; # 554292) verwendet. Der verwendete Sekundärantikörper war Ziege anti-Maus IgG (H+L)-Cy3 (polyklonal-Ziege; anti-Maus; IgG Fab-Fragment; Verdünnung 1:50; Konjugation Cy3 (Indocarbocyanin); Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA; # 115-167-003). Anschließend wurde mit Blocking Solution (Zytomed # BS-0001-4) geblockt.

Danach erfolgte die Detektion von Synaptophysin. Als Primärantikörper wurde Anti-Synaptophysin [Snp88] (Klon Snp 88; monoklonal-Maus; Verdünnung 1:50; BioGenex, San Ramon, USA; # MU363-UC) verwendet. Der verwendete Sekundärantikörper war Ziege anti-Maus IgG (H+L)-Alexa Fluor 488 (polyklonal-Ziege; anti-Maus; IgG Gesamtmolekül; Verdünnung 1:50; Konjugation Alexa

Fluor 488; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA; # 115-545-003). Im Anschluss wurden die Zellkerne mit DAPI (ProLong Gold antifade reagent with DAPI; Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA; # P36935) angefärbt.

Die Auswertung erfolgte in 630- und 1000-facher Vergrößerung mit Immersionsöl am Mikroskop Axio Imager M2 und der Software AxioVision von Zeiss (Zeiss, Jena, Deutschland). Die verwendeten Filter sind in Tabelle 9 dargestellt.

**Tabelle 8: Eigenschaften der für die Doppelimmunfluoreszenz Auswertung verwendeten Filter.**

Filter	Anregung	Strahlteiler	Emission
DAPI-Filter (blau) Filtersatz 49	G 365	FT 395	BP 445/50
eGFP-Filter (grün) Filtersatz 38HE	470/40 (HE)	FT 495 (HE)	BP 525/50 (HE)
DsRed-Filter (rot) Filtersatz 45	BP 560/40	FT 585	BP 630/75

Zunächst wurde mit dem eGFP-Filter nach neuroendokrinen Zellen in der Darmmukosa gesucht. Diese Zellen sind häufig pyramiden- oder flaschenförmig und liegen meist in der Kryptenbasis. Ausschlaggebend für die Identifizierung war die Expression von Synaptophysin, einem Markerprotein neuroendokriner Zellen, das durch die Konjugation mit Alexa Fluor 488 durch eine grün-Fluoreszenz der Zellen nachgewiesen wurde. Von den identifizierten Zellen wurden mit den Filtern DAPI, eGFP und DsRed Aufnahmen gemacht. Durch Überlagerung der einzelnen Aufnahmen konnte die Expression von Maspin, das durch Kopplung mit Cy3 (Indocarbocyanin) zu einer rot-Fluoreszenz führte, in neuroendokrinen Zellen untersucht werden, da gleichzeitige Grün- (Synaptophysin, neuroendokriner Marker) und Rotfärbung (Maspin) zu einer gelben Farbe führt (Abbildung 13). Insgesamt wurden 288 Zellen ausgewertet.

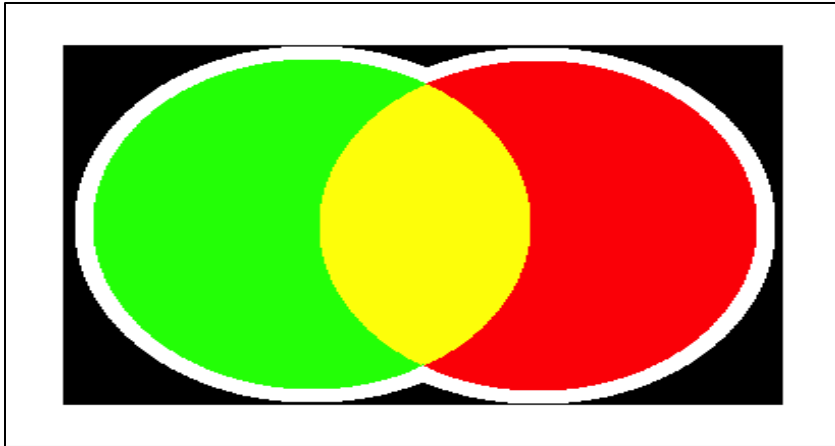


Abbildung 13: Schematische Darstellung zum Nachweis von Maspin in neuroendokrinen Zellen. Gleichzeitige Expression von Synaptophysin (grün) und Maspin (rot) führt zu einer Gelbfärbung der Zelle.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 HE Färbung

Auf allen untersuchten Gewebeschnitten konnte mittels mikroskopischer Auswertung der HE gefärbten Slides die Diagnose eines neuroendokrinen Tumors verifiziert werden (Abbildung 14).

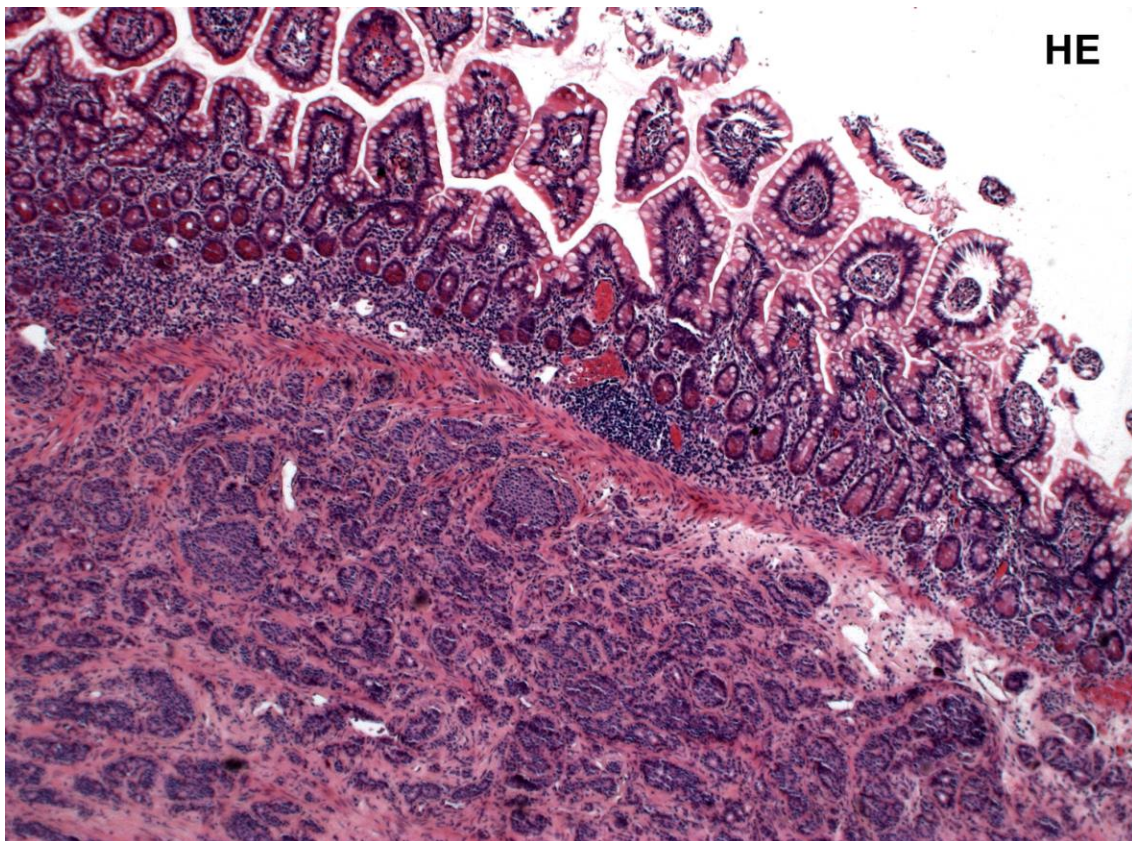


Abbildung 14: Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE Färbung) eines neuroendokrinen Tumors des Ileums (unten) und der unveränderten Darmschleimhaut (oben)(50x).



### 3.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

In 56 der 87 untersuchten Fälle (65%) wurde ein Verlust von Chromosom 18 gefunden. Neun Fälle wiesen einen partiellen Verlust auf, bei dem neben unveränderte Zellen auch Zellen mit Chromosom 18 Verlust im Tumor vorlagen. 21 Fälle zeigten keine Veränderung. 1 Fall konnte auch nach mehrfacher Färbung nicht ausgewertet werden (Abbildung 16).

Beurteilt wurde die Signalanzahl (1 Signal: Verlust von Chromosom 18; 2 Signale: kein Verlust) in einzelnen Zellen des Tumorareals (Abbildung 15).

Die einzelnen Kohorten zeigten Verluste von Chromosom 18 in 55% (Kohorte 1), 72% (Kohorte 2) und 64% (Kohorte 3) der Fälle (Abbildung 17).

In 68 der 87 Fälle (78%) wurden neben der Auswertung klassischer Gewebeschnitte Tissue-Microarrays untersucht. Hier zeigten sich keine Abweichungen der Ergebnisse.

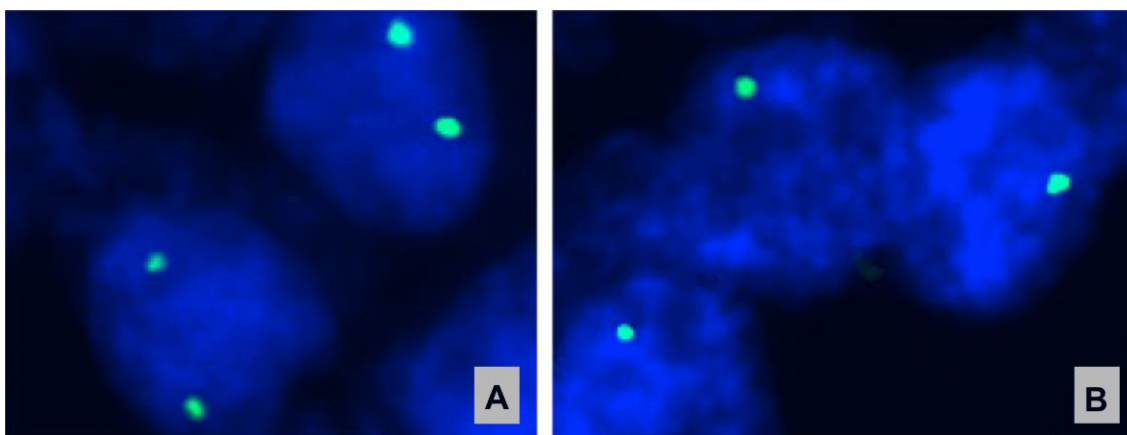


Abbildung 15: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) zum Nachweis von Chromosom 18 in neuroendokrinen Tumoren des Ileums bei 1000x Vergrößerung.

A: 2 Signale pro Zellkern: Kein Verlust von Chromosom 18

B: 1 Signal pro Zellkern: Verlust eines Chromosoms

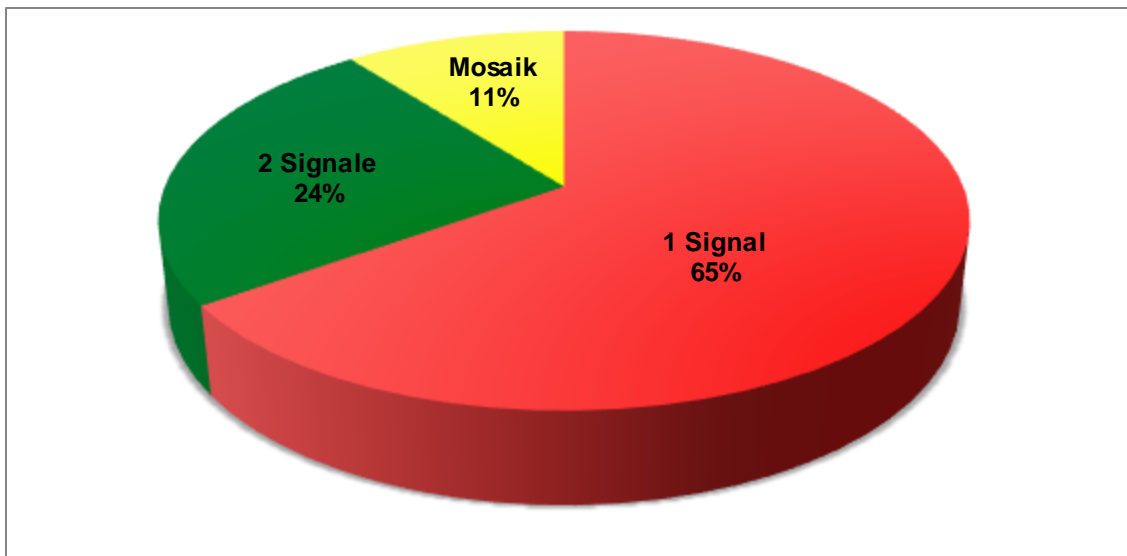


Abbildung 16: Ergebnisse der FISH Untersuchung für Verluste von Chromosom 18. Von den 87 untersuchten Tumoren zeigten 56 (65%) einen Chromosom 18 Verlust (1 Signal). 21 Fälle (24%) zeigten keine Veränderung (2 Signale) und 9 Fälle (11%) zeigten ein Mosaik, bei dem im Tumoreal sowohl Zellen mit Chromosom 18 Verlust als auch Zellen ohne Veränderung vorlagen.

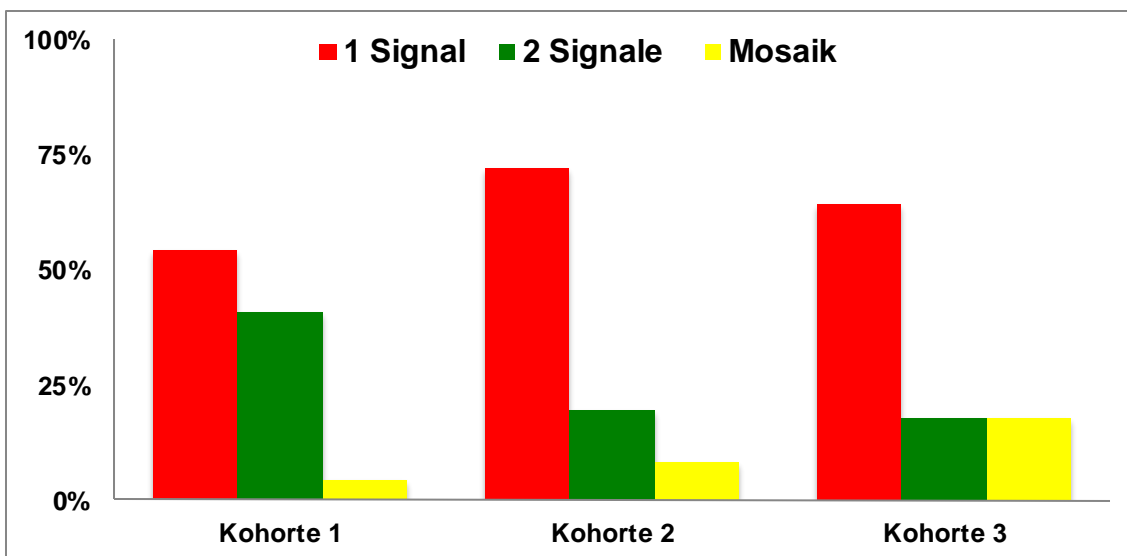


Abbildung 17: Ergebnisse der FISH Untersuchung für Verluste von Chromosom 18 der jeweiligen Kohorten.

In Kohorte 1 (T1-3, N0, M0) zeigten von den 22 untersuchten Fällen 12 (54,5%) einen Chromosom 18 Verlust, 9 Fälle (40,9%) keinen Verlust und 1 Fall (4,5%) einen partiellen Verlust (Mosaik). In Kohorte 2 (T1-4, N1, M0) zeigten 26 (72,2%) der 36 untersuchten Fälle einen Verlust von Chromosom 18, 7 (19,4%) keinen Verlust und 3 Fälle (8,3%) ein Mosaik. In Kohorte 3 (T1-4, N0-1, M1) zeigten 18 (64,3%) der 28 ausgewerteten Fälle einen Chromosom 18 Verlust, 5 Fälle (17,9%) zeigten keinen Verlust und 5 Fälle (17,9%) wiesen ein Mosaik auf. 1 Fall der Kohorte 3 konnte nicht ausgewertet werden.

### 3.3 Immunhistochemie

Auf 80 der 87 Tumorblöcke konnte Normalgewebe identifiziert und als interne Positivkontrolle für den immunhistochemischen Nachweis der Tumorsuppressorgene DCC, Smad2, Smad4/DPC4 und Maspin/SerpinB5 verwendet werden.

Alle untersuchten Tumore exprimierten DCC und Smad2 unverändert zum Normalgewebe (Abbildung 18 und 19).

Smad4/DPC4 wurde von 84 der 87 untersuchten Tumore exprimiert (Abbildung 20).

Die Fälle I001, I002 und I005 waren negativ bei positiver Färbung des Normalgewebes (Abbildung 21).

Maspin wurde in keinem der untersuchten Tumore exprimiert. Die interne Kontrolle war in allen Fällen positiv (Abbildung 22).

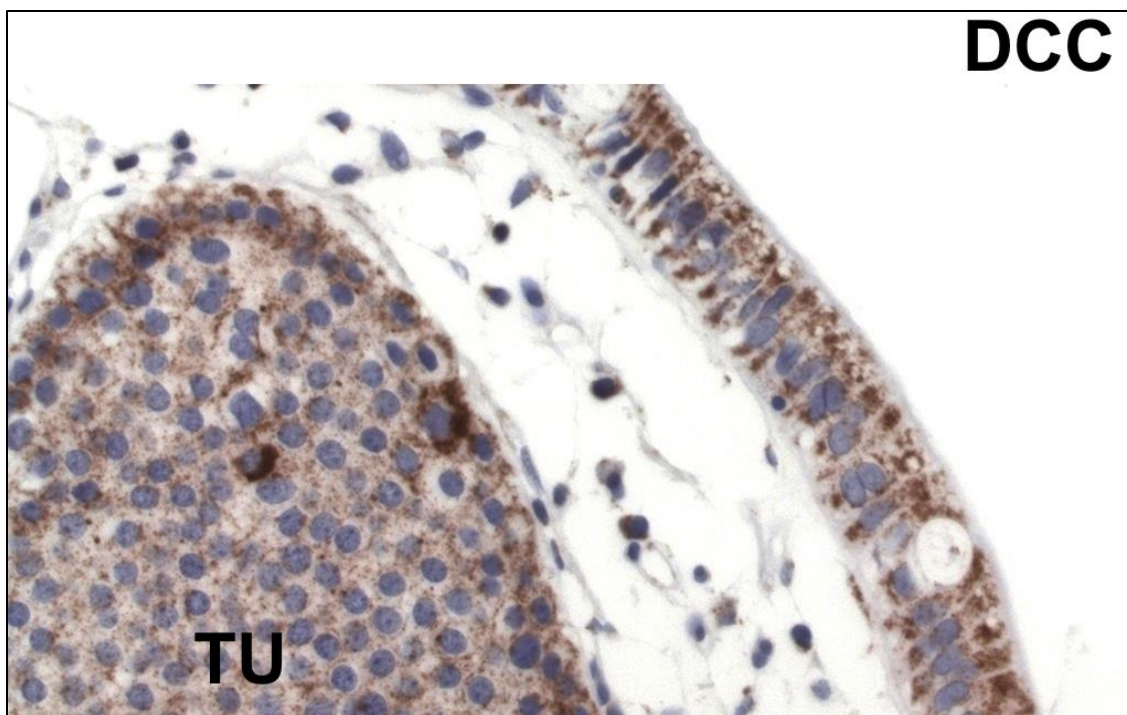


Abbildung 18: Moderate bis starke zytoplasmatische Expression von DCC in einem neuroendokrinen Tumor (TU) des Ileums und dem normalen Epithel (400x).



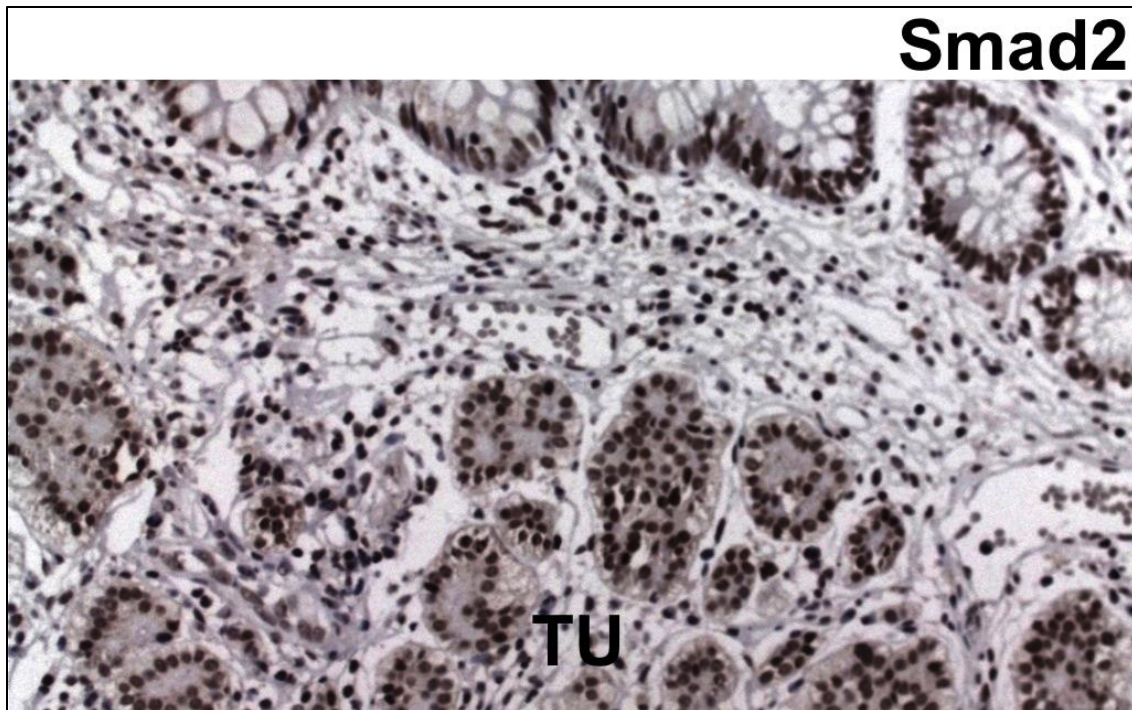


Abbildung 19: Starke nukleäre Expression von Smad2 in einem neuroendokrinen Tumor (TU) des Ileums und dem normalen Epithel (200x).

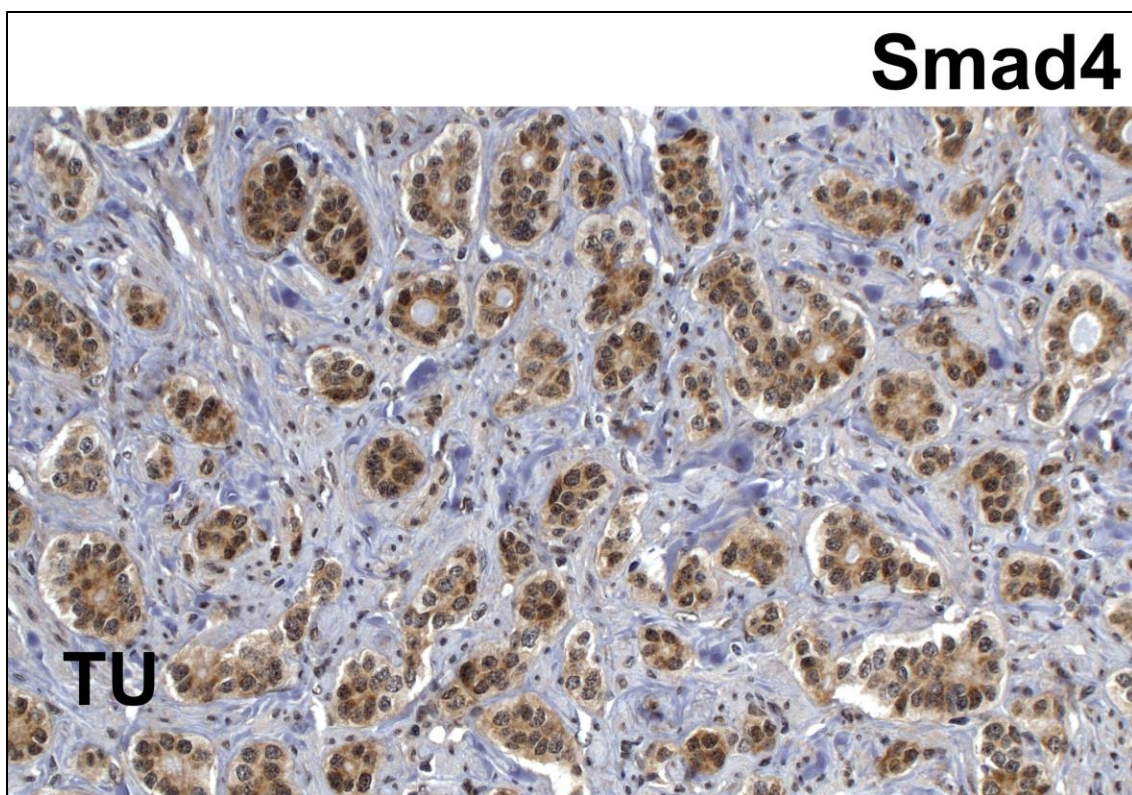


Abbildung 20: Starke nukleäre Expression von Smad4 in einem neuroendokrinen Tumor (TU) des Ileums (200x).



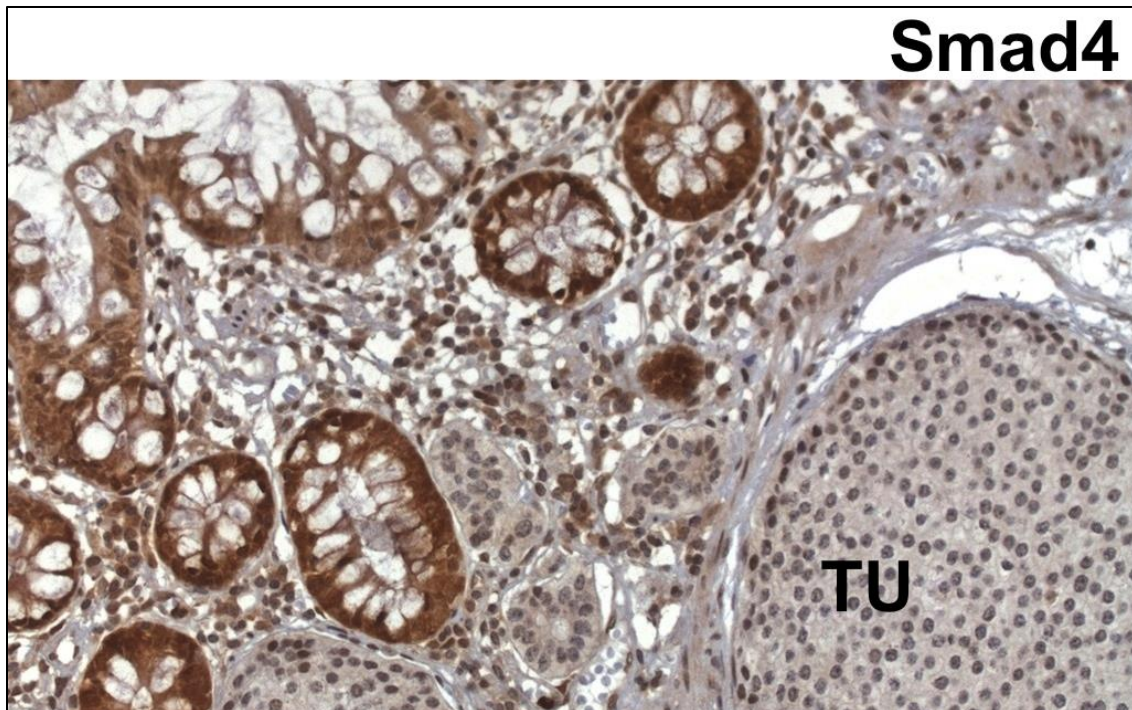


Abbildung 21: Verlust von Smad4 in einem neuroendokrinen Tumor (TU) des Ileums bei starker Expression im Epithel der normalen Mukosa (200x).

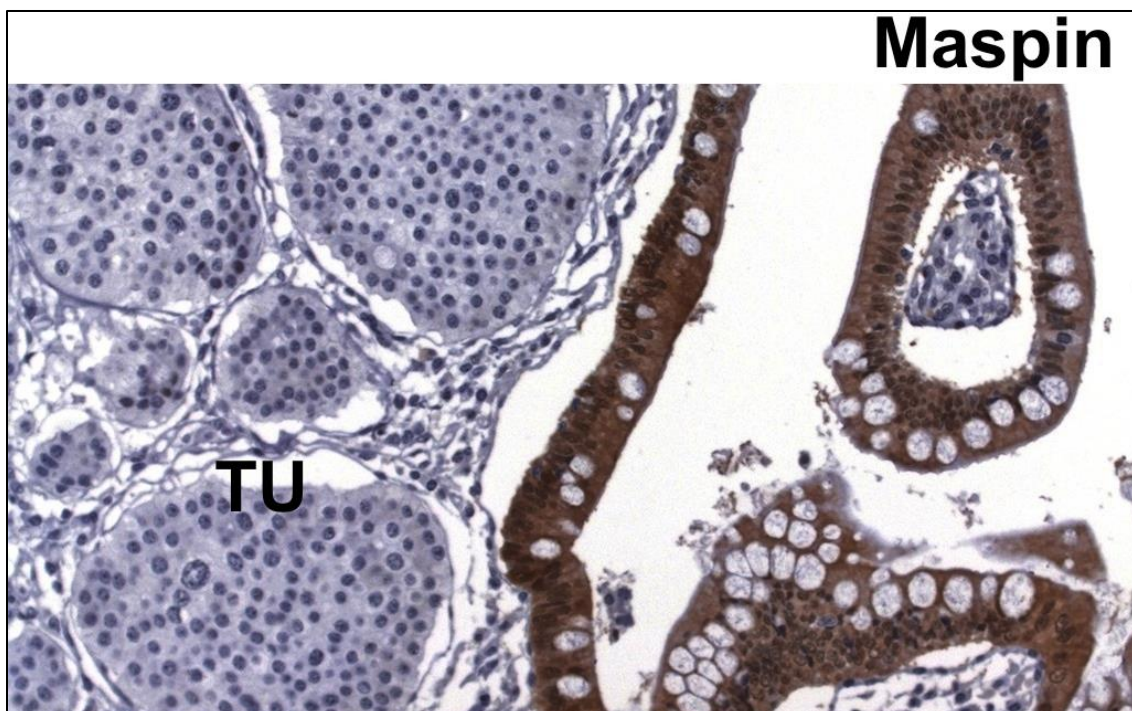


Abbildung 22: Maspin wird von neuroendokrinen Tumoren des Ileums nicht exprimiert (TU, Tumor). Die starke Expression in der normalen Mukosa des Ileums dient als Positivkontrolle(200x).

### 3.4 Doppelimmunfluoreszenz

Doppelimmunfluoreszenz Analysen der ilealen Mukosa für Synaptophysin, als Marker für neuroendokrine Zellen, und Maspin, das in NETs des Mitteldarms nicht immunhistochemisch nachgewiesen werden konnte, zeigten, dass neuroendokrine Zellen der Mukosa des Ileums ebenfalls kein Maspin exprimieren (Abbildung 23).

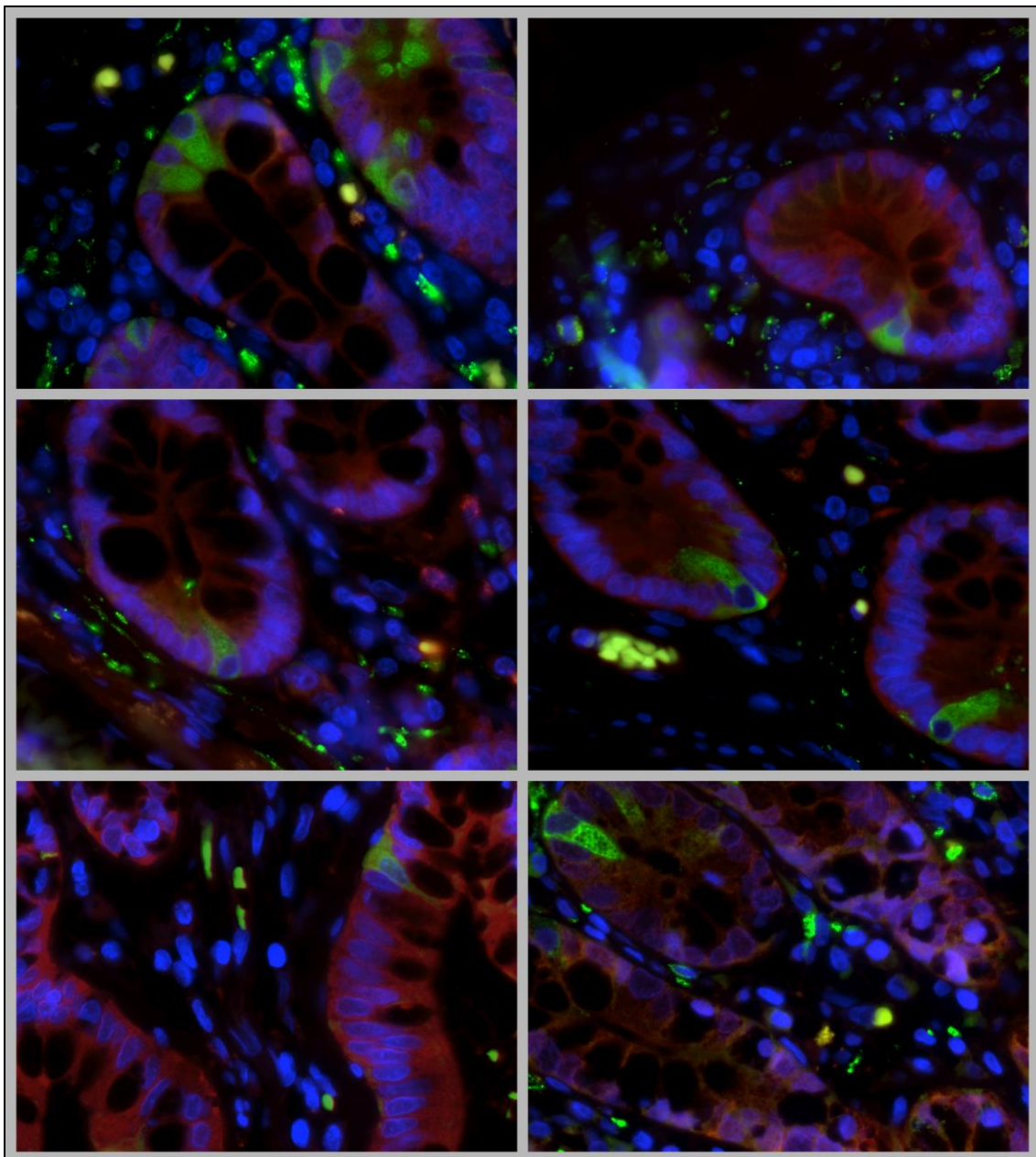


Abbildung 23: Doppelimmunfluoreszenz Färbung für Synaptophysin (grün) und Maspin (rot). Neuroendokrine Zellen der Ileummukosa können durch die Expression von Synaptophysin identifiziert werden. Eine Koexpression von Maspin in diesen Zellen kann nicht nachgewiesen werden.



## 4. Diskussion

Die Bezeichnung neuroendokrine Neoplasien des Gastrointestinaltraktes umfasst eine heterogenen Gruppe von Neoplasien die aus Zellen des diffusen neuroendokrinen Systems entstehen, zur Synthese, Speicherung und Sekretion bioaktiver Peptide und Amine fähig sind und so zu charakteristischen Hypersekretionssyndromen führen können [1, 2].

Ihre Inzidenz ist in den letzten 30 Jahren signifikant angestiegen, was vor allem durch ein steigendes Bewusstsein über die Erkrankung unter Ärzten und verbesserte diagnostische Möglichkeiten erklärt wird [1, 7].

Sie werden einerseits bezüglich ihres embryologischen Ursprungs in Tumore des Vorder-, Mittel- und Enddarms, und andererseits im Hinblick auf ihre Fähigkeit Hormonhypersekretionssyndrome auszulösen in funktionell aktive und nicht aktive Tumore unterteilt [2, 13]. Es existieren von der ENETS und der UICC vorgeschlagene TNM Stadien und eine Klassifikation der WHO aus dem Jahr 2010, in der neuroendokrine Neoplasien hinsichtlich Differenzierung und proliferativer Aktivität in gut differenzierte neuroendokrine Tumore und schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome unterteilt werden [14, 17, 18].

Die Diagnostik neuroendokriner Neoplasien basiert neben ihrem klinischen Erscheinungsbild, das häufig unspezifisch ist, vor allem auf bildgebenden Verfahren sowie dem Nachweis spezifischer und unspezifischer Tumormarker mittels Hormonuntersuchungen und histopathologischer Diagnostik [21].

Prognostisch gelten sie als eher indolent verlaufende Erkrankung. 5-Jahres-Überlebensraten liegen durchschnittlich zwischen 50% [9] und 77,5% [8] und sind abhängig von prognostischen Faktoren wie Geschlecht, Alter bei Diagnosestellung, Differenzierung/Grading, Lokalisation des Primärtumors und Stadium der Erkrankung [7].

Neuroendokrine Tumore des Ileums stellen eine der häufigsten neuroendokrinen Neoplasien im gastroenteropankreatischen System dar [2, 7]. Sie entstehen meist nahe der Ileozökalklappe als ungestielte Knoten und häufig multifokal. Histologisch ist ein insuläres Wachstumsmuster aus monomorphen Zellen mit

gleichförmigen Zellkernen, die kaum zytologische Atypien und niedrige Mitoseraten aufweisen, typisch [13, 25].

Ihren Ursprung haben neuroendokrine Tumore des Ileums vorwiegend in Enterochromaffinen Zellen (EC-Zellen), die in der Lage sind große Mengen an Serotonin zu bilden und freizusetzen, was EC-Zell-Tumore häufig beibehalten. So können sie, neben Symptomen die durch lokales Wachstum des Primarius entstehen, durch vermehrte Serotoninsekretion auch zu chronischer Diarrhöe, Flush-Attacken, intermittierender bronchialer Obstruktion und Sklerosierung der Herzklappen führen, was gemeinsam als Karzinoïdsyndrom bezeichnet wird [2, 14, 27].

Die genauen biologischen Vorgänge, die für die Entwicklung von EC-Zellen zu neuroendokrinen Tumoren verantwortlich sind, sind noch weitgehend unbekannt. Genetische Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass NETs des Mitteldarms eine Vielzahl an chromosomalen Aberrationen aufweisen, die möglicherweise eine Rolle in der Tumorgenese spielen [32].

Unterschiedliche Studien haben gezeigt, dass chromosomale Veränderungen vor allem auf Chromosom 18 konzentriert zu sein scheinen. Verluste des kompletten Chromosoms oder des langen Arms wurden in bis zu 88,9% [32] der untersuchten Fälle gefunden und sind mit einem Durchschnitt von 72,2% [32-42] die mit Abstand häufigste Auffälligkeit.

Wir führten mit einer Sonde die in der Zentromerregion von Chromosom 18 bindet eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung durch, um Verluste von Chromosom 18 in neuroendokrinen Tumoren des Mitteldarms zu identifizieren. In unserer Studie zeigten 65% der 87 untersuchten Fälle einen kompletten Verlust von Chromosom 18. Weitere 11% wiesen ein Mosaik auf, bei dem neben unveränderten Zellen auch solche mit Chromosom 18 Verlust im Tumor vorlagen. Nur in 24% der Fälle konnten wir keine Veränderungen feststellen.

Wir unterteilten die untersuchten Fälle bezüglich ihres TNM Stadiums in 3 Kohorten (Kohorte 1: T1-3,N0,M0; Kohorte 2: T1-4,N1,M0; Kohorte 3 T1-4, N0-



1, M1), um mögliche Unterschiede zu detektieren. Verluste von Chromosom 18 wurden in 55% (Kohorte 1), 72% (Kohorte 2) und 64% (Kohorte 3) gefunden.

Da Verluste von Chromosom 18 sowohl in lokalisierten als auch in metastasierten Erkrankungsstadien gefunden wurden, scheinen Verluste ein frühes Ereignis in der Tumorgenese neuroendokriner Tumore des Mitteldarms und nicht verantwortlich für Tumorprogression und Metastasenbildung zu sein. Auch dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen die in anderen Studien beschrieben wurden [2].

Die in vielen Studien beschriebenen Verluste von Chromosom 18 sprechen für eine Beteiligung von auf Chromosom 18 vorliegenden Genen in der Tumorgenese neuroendokriner Tumore des Mitteldarms. Bekannte Tumorsuppressorgene die hier lokalisiert sind, sind DCC (18q21.3), Smad2 (18q21.1), Smad4/DPC4 (18q21.1) und Maspin/SerpinB5 (18q21.3).

In unserer Studie untersuchten wir deshalb die Expression dieser Gene mittels immunhistochemischer Färbungen, wobei als interne Positivkontrolle auf den Tumorschnitten vorhandenes Normalgewebe verwendet wurde.

Alle untersuchten Tumore exprimierten DCC und Smad2 unverändert zum Normalgewebe. Smad4 wurde von 84 der 87 (97%), Maspin von keinem der untersuchten Tumore exprimiert. Die interne Kontrolle war in allen Fällen positiv. Aufgrund der Ergebnisse untersuchten wir die Expression von Maspin in neuroendokrinen Zellen der normalen Mukosa mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung für Synaptophysin, als Marker für neuroendokrine Zellen, und Maspin. Hier konnten wir zeigen, dass in neuroendokrinen Zellen der Mukosa Maspin nicht exprimiert wird.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die auf Chromosom 18 bekannten Tumorsuppressorgene DCC, Smad2, Smad4 und Maspin keine Rolle in der Tumorgenese neuroendokriner Tumore des Mitteldarms spielen, was für DCC, Smad2 und Smad4 bereits in der Literatur berichtet wurde [43, 44].

Die hohe Frequenz von Chromosom 18 Verlusten in neuroendokrinen Tumoren des Mitteldarms spricht stark für eine Beteiligung dieser Veränderung in der

Tumorgenese der meisten NETs dieser Lokalisation. Die auf Chromosom 18 bekannten Tumorsuppressorgene DCC, Smad2, Smad4 und Maspin scheinen allerdings nicht von Bedeutung zu sein. In zusätzlichen Studien sollte versucht werden Tumorsuppressorgene auf Chromosom 18, die an der Entstehung neuroendokriner Tumore des Mitteldarms beteiligt sind, zu identifizieren um die Vorgänge die zur Entstehung neuroendokriner Tumore des Mitteldarms führen besser zu verstehen und so zukünftig zu einer Verbesserung von Diagnostik, Therapie und Prognose betroffener Patienten beizutragen.

## 5. Zusammenfassung

Neuroendokrine Tumore des Ileums stellen eine seltene, in ihrer Inzidenz aber zunehmende Tumorentität dar [1, 6-10]. Da Symptome in frühen Krankheitsstadien meist unspezifisch sind oder fehlen, wird die Diagnose häufig erst in lokal fortgeschrittenen oder bereits fernmetastasierten Stadien gestellt, was eine Behandlung in kurativer Absicht erschwert oder gar unmöglich macht [12,19].

Die pathogenetischen Mechanismen die zur Entstehung führen sind bislang weitgehend unbekannt [2]. Verschiedene Studien konnten Verluste von Chromosom 18 in neuroendokrinen Neoplasien des Ileums nachweisen, was eine Beteiligung eines oder mehrerer Gene, die auf diesem Chromosom lokalisiert sind, nahe legt [2, 43, 44].

Ein besseres Verständnis der Mechanismen die an der Entstehung ilealer NETs beteiligt sind, könnte zukünftig zu Verbesserungen in Diagnostik, Therapie und Prognose betroffener Patienten beitragen.

Wir untersuchten Gewebeproben von 87 Primärtumoren neuroendokriner Tumore des Mitteldarms. Diese wurden bezüglich ihres TNM Stadiums in drei Kohorten (Kohorte 1: T1-3, N0, M0; Kohorte 2: T1-4, N1, M0; Kohorte 3: T1-4, N0-1, M1) unterteilt. Mittels FISH und mikroskopischer Auswertung wurden die Tumore auf Verluste von Chromosom 18 untersucht. Insgesamt zeigten 76% (65/87) der untersuchten Tumore Veränderungen von Chromosom 18. Ein kompletter Verlust wurde in 65% (56/87) der untersuchten Fälle gefunden. Weitere 11 % (9/87) wiesen einen partiellen Verlust auf, bei dem neben unveränderte Zellen auch Zellen mit Chromosom 18 Verlust im Tumor vorlagen. Die einzelnen Kohorten zeigten Verluste von Chromosom 18 in 55% (Kohorte 1), 72% (Kohorte 2) und 64% (Kohorte 3) der Fälle.

Auf Chromosom 18 existieren 4 bekannte Tumorsuppressorgene (DCC (18q21.3), SMAD2 (18q21.1), SMAD4/DPC4 (18q21.1) und Maspin/SerpinB5 (18q21.3)). Deren Expression in den 87 Primärtumoren wurde mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht. Alle untersuchten Tumore exprimierten DCC und Smad2.

Smad4 wurde von 84 der 87 (97%), Maspin von keinem der untersuchten Tumore exprimiert.

Aufgrund der Ergebnisse untersuchten wir neuroendokrine Zellen der normalen Mukosa des Ileums bezüglich ihrer Expression von Maspin mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung und konnten nachweisen, dass diese Maspin nicht exprimieren.

Die hohe Frequenz von Chromosom 18 Verlusten in neuroendokrinen Tumoren des Ileums legt eine Beteiligung dieser Veränderung in der Tumorgenese nahe. Dabei scheinen die Tumorsuppressorgene DCC, Smad2, Smad4 und Maspin allerdings keine Rolle zu spielen. Zukünftig sollte versucht werden weitere Tumorsuppressorgene auf Chromosom 18 die eine Rolle bei der Entstehung neuroendokriner Tumore des Ileums spielen zu identifizieren um die Entstehung ilealer NETs besser zu verstehen und so zukünftig zu einer Verbesserung von Diagnostik, Therapie und Prognose betroffener Patienten beizutragen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, et al. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *The lancet oncology*. 2008;9(1):61-72. Epub 2008/01/08.
2. Schimmack S, Svejda B, Lawrence B, Kidd M, Modlin IM. The diversity and commonalities of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft für Chirurgie*. 2011;396(3):273-98. Epub 2011/01/29.
3. Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer*. 2003;97(4):934-59. Epub 2003/02/06.
4. Arnold R. Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Introduction: definition, historical aspects, classification, staging, prognosis and therapeutic options. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2005;19(4):491-505. Epub 2005/09/27.
5. Massironi S, Sciola V, Peracchi M, Ciafardini C, Spampatti MP, Conte D. Neuroendocrine tumors of the gastro-entero-pancreatic system. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2008;14(35):5377-84. Epub 2008/09/23.
6. Landerholm K, Falkmer S, Jarhult J. Epidemiology of small bowel carcinoids in a defined population. *World journal of surgery*. 2010;34(7):1500-5. Epub 2010/03/20.
7. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, et al. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(18):3063-72. Epub 2008/06/21.
8. Garcia-Carbonero R, Capdevila J, Crespo-Herrero G, Diaz-Perez JA, Martinez Del Prado MP, Alonso Orduna V, et al. Incidence, patterns of care and prognostic factors for outcome of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors (GEP-NETs): results from the National Cancer Registry of Spain (RGETNE). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21(9):1794-803. Epub 2010/02/09.
9. Hauso O, Gustafsson BI, Kidd M, Waldum HL, Drozdov I, Chan AK, et al. Neuroendocrine tumor epidemiology: contrasting Norway and North America. *Cancer*. 2008;113(10):2655-64. Epub 2008/10/15.
10. Ito T, Sasano H, Tanaka M, Osamura RY, Sasaki I, Kimura W, et al. Epidemiological study of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors in Japan. *Journal of gastroenterology*. 2010;45(2):234-43. Epub 2010/01/09.
11. Hassan MM, Phan A, Li D, Dagohoy CG, Leary C, Yao JC. Risk factors associated with neuroendocrine tumors: A U.S.-based case-control study. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008;123(4):867-73. Epub 2008/05/21.
12. Oberg K, Castellano D. Current knowledge on diagnosis and staging of neuroendocrine tumors. *Cancer metastasis reviews*. 2011;30 Suppl 1:3-7. Epub 2011/02/12.
13. Kloppel G, Rindi G, Anlauf M, Perren A, Komminoth P. Site-specific biology and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2007;451 Suppl 1:S9-27. Epub 2007/08/09.
14. Kloppel G. Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocrine-related cancer*. 2011;18 Suppl 1:S1-16. Epub 2011/10/26.
15. Rindi G, Wiedenmann B. Neuroendocrine neoplasms of the gut and pancreas: new insights. *Nature reviews Endocrinology*. 2012;8(1):54-64. Epub 2011/08/03.
16. Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, Lloyd RV, Suster S. The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas*. 2010;39(6):707-12. Epub 2010/07/29.

17. Rindi G, Kloppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, et al. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2006;449(4):395-401. Epub 2006/09/13.
18. Rindi G, Kloppel G, Couvelard A, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, et al. TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2007;451(4):757-62. Epub 2007/08/04.
19. Frilling A, Akerstrom G, Falconi M, Pavel M, Ramos J, Kidd M, et al. Neuroendocrine tumor disease: an evolving landscape. *Endocrine-related cancer*. 2012;19(5):R163-R85. Epub 2012/05/31.
20. Fottner C, Weber MM. [Neuroendocrine neoplasms of the gastrointestinal tract. Classification, clinical presentation and diagnosis]. *Der Internist*. 2012;53(2):131-44. Epub 2012/02/01. Neuroendokrine Neoplasien des Gastrointestinaltrakts. Klassifikation, Klinik und Diagnose.
21. Oberg K. Diagnostic work-up of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67 Suppl 1:109-12. Epub 2012/05/25.
22. Niederle MB, Hackl M, Kaserer K, Niederle B. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours: the current incidence and staging based on the WHO and European Neuroendocrine Tumour Society classification: an analysis based on prospectively collected parameters. *Endocrine-related cancer*. 2010;17(4):909-18. Epub 2010/08/13.
23. Rosai J. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology - 2 Volume Set: Expert Consult: Online and Print: Elsevier Health Sciences*; 2011.
24. Hunt JL, Cagle PT. *Molecular Pathology of Endocrine Diseases*: Springer; 2010.
25. Iacobuzio-Donahue CA, Montgomery E. *Gastrointestinal and liver pathology*. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2012; Available from: <http://site.ebrary.com/id/10493341>.
26. Khan A. *Surgical Pathology of Endocrine and Neuroendocrine Tumors*: Humana Press; 2009.
27. Gustafsson BI, Kidd M, Modlin IM. Neuroendocrine tumors of the diffuse neuroendocrine system. *Current opinion in oncology*. 2008;20(1):1-12. Epub 2007/11/29.
28. Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Stemmermann GN, Lantz PE, Isaacson PG. *Gastrointestinal Pathology: An Atlas and Text*: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
29. de Herder WW. Tumours of the midgut (jejunum, ileum and ascending colon, including carcinoid syndrome). *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2005;19(5):705-15. Epub 2005/10/29.
30. Srivastava A, Hornick JL. Immunohistochemical staining for CDX-2, PDX-1, NESP-55, and TTF-1 can help distinguish gastrointestinal carcinoid tumors from pancreatic endocrine and pulmonary carcinoid tumors. *The American journal of surgical pathology*. 2009;33(4):626-32. Epub 2008/12/10.
31. Cunningham JL, Janson ET. The biological hallmarks of ileal carcinoids. *European journal of clinical investigation*. 2011;41(12):1353-60. Epub 2011/05/25.
32. Cunningham JL, Diaz de Stahl T, Sjoblom T, Westin G, Dumanski JP, Janson ET. Common pathogenetic mechanism involving human chromosome 18 in familial and sporadic ileal carcinoid tumors. *Genes, chromosomes & cancer*. 2011;50(2):82-94. Epub 2010/11/26.
33. Andersson E, Sward C, Stenman G, Ahlman H, Nilsson O. High-resolution genomic reveals gain of chromosome 14 as a predictor of poor outcome in ileal carcinoids. *Endocrine-related cancer*. 2009;16(3):953-66. Epub 2009/05/22.
34. Kulke MH, Freed E, Chiang DY, Phillips J, Zahrieh D, Glickman JN, et al. High-resolution analysis of genetic alterations in small bowel carcinoid tumors reveals areas of recurrent amplification and loss. *Genes, chromosomes & cancer*. 2008;47(7):591-603. Epub 2008/04/03.
35. Kim do H, Nagano Y, Choi IS, White JA, Yao JC, Rashid A. Allelic alterations in well-differentiated neuroendocrine tumors (carcinoid tumors) identified by genome-wide single nucleotide polymorphism analysis and comparison with pancreatic endocrine tumors. *Genes, chromosomes & cancer*. 2008;47(1):84-92. Epub 2007/10/19.

36. Tonnies H, Toliat MR, Ramel C, Pape UF, Neitzel H, Berger W, et al. Analysis of sporadic neuroendocrine tumours of the enteropancreatic system by comparative genomic hybridisation. *Gut*. 2001;48(4):536-41. Epub 2001/03/15.
37. Kytola S, Hoog A, Nord B, Cedermark B, Frisk T, Larsson C, et al. Comparative genomic hybridization identifies loss of 18q22-qter as an early and specific event in tumorigenesis of midgut carcinoids. *The American journal of pathology*. 2001;158(5):1803-8. Epub 2001/05/05.
38. Zhao J, de Krijger RR, Meier D, Speel EJ, Saremaslani P, Muletta-Feurer S, et al. Genomic alterations in well-differentiated gastrointestinal and bronchial neuroendocrine tumors (carcinoids): marked differences indicating diversity in molecular pathogenesis. *The American journal of pathology*. 2000;157(5):1431-8. Epub 2000/11/14.
39. Terris B, Meddeb M, Marchio A, Danglot G, Flejou JF, Belghiti J, et al. Comparative genomic hybridization analysis of sporadic neuroendocrine tumors of the digestive system. *Genes, chromosomes & cancer*. 1998;22(1):50-6. Epub 1998/05/20.
40. Lollgen RM, Hessman O, Szabo E, Westin G, Akerstrom G. Chromosome 18 deletions are common events in classical midgut carcinoid tumors. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2001;92(6):812-5. Epub 2001/05/15.
41. Wang GG, Yao JC, Worah S, White JA, Luna R, Wu TT, et al. Comparison of genetic alterations in neuroendocrine tumors: frequent loss of chromosome 18 in ileal carcinoid tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2005;18(8):1079-87. Epub 2005/05/28.
42. Stancu M, Wu TT, Wallace C, Houlihan PS, Hamilton SR, Rashid A. Genetic alterations in goblet cell carcinoids of the vermiform appendix and comparison with gastrointestinal carcinoid tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2003;16(12):1189-98. Epub 2003/12/19.
43. Oberg K. Genetics and molecular pathology of neuroendocrine gastrointestinal and pancreatic tumors (gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors). *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2009;16(1):72-8. Epub 2009/01/01.
44. Perren A, Anlauf M, Komminoth P. Molecular profiles of gastroenteropancreatic endocrine tumors. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2007;451 Suppl 1:S39-46. Epub 2007/08/09.
45. Nilsson O. Profiling of GEPNETs. *ISRN Neuroendocrinology*. 2012;2012:11.
46. Vogelstein B, Kinzler KW. *The genetic basis of human cancer*: McGraw-Hill, Medical Pub. Division; 2002.
47. Kong XT, Choi SH, Inoue A, Xu F, Chen T, Takita J, et al. Expression and mutational analysis of the DCC, DPC4, and MADR2/JV18-1 genes in neuroblastoma. *Cancer research*. 1997;57(17):3772-8. Epub 1997/09/01.
48. Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(16):3420-8. Epub 2004/08/18.
49. Attisano L, Lee-Hoeflich ST. The Smads. *Genome biology*. 2001;2(8):REVIEWS3010. Epub 2001/09/05.
50. Gulubova M, Manolova I, Ananiev J, Julianov A, Yovchev Y, Peeva K. Role of TGF-beta1, its receptor TGFbetaRII, and Smad proteins in the progression of colorectal cancer. *International journal of colorectal disease*. 2010;25(5):591-9. Epub 2010/02/19.
51. Smith SL, Watson SG, Ratschiller D, Gugger M, Betticher DC, Heighway J. Maspin - the most commonly-expressed gene of the 18q21.3 serpin cluster in lung cancer - is strongly expressed in preneoplastic bronchial lesions. *Oncogene*. 2003;22(54):8677-87. Epub 2003/12/04.
52. Teoh SS, Whisstock JC, Bird PI. Maspin (SERPINB5) is an obligate intracellular serpin. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(14):10862-9. Epub 2010/02/04.