Technische Universität München
II. Medizinische Klinik und Poliklinik
des Klinikums rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

EC-Zellkarzinoide des Ileums:

Expression von Matrixmetalloproteinasen und angiogenen Wachstumsfaktoren

Sophie-Charlotte Besig

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Chr. Prinz
2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel
3. Univ.-Prof. Dr. F. R. Greten

Die Dissertation wurde am 05.01.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.09.2011 angenommen.

Meiner Mutter
in Liebe und Dankbarkeit

Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Voland, P.; Besig, S.; Rad, R.; Braun, T.; Baur, D.M.; Perren, A.; Langer, R.; Höfler, H.; Prinz, C.: Correlation of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase Expression in Ileal Carcinoids, Lymph Nodes and Liver Metastasis with Prognosis and Survival. Neuroendocrinology (2009; Epub 2008), Band 89 (1), S. 66-78; PMID: 18708724 [513]

Besig, S.; Voland, P.; Baur, D.M.; Perren, A.; Prinz, C.: Vascular Endothelial Growth Factors, Angiogenesis, and Survival in Human Ileal Enterochromaffin Cell Carcinoids. Neuroendocrinology (2009), Band 90 (4), S. 402-415; PMID: 19816005 [38]

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis 6
1. Einleitung 9
1.1. Das Karzinoid des Ileums 9
1.2. Untersuchungsschwerpunkte 21
1.2.1. Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren 21
1.2.2. Vaskuläre Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren 23
1.2.3. Angiogenese 24
1.2.4. Lymphangiogenese 25
1.3. Zielsetzung 27
2. Material und Methoden 28
2.1. Übersicht 28
2.2. Häufig verwendetes Material 28
2.2.1. Puffer 28
2.2.2. Chemikalien 29
2.3. Zellkultur 29
2.3.1. Zelllinien 29
2.3.2. Praktische Durchführung 30
2.4. Ileales Karzinoid 32
2.4.1. Patientenpopulation 32
2.4.2. Klinische Daten 32
2.4.2.1. Studiendesign 32
2.4.2.2. Patientencharakterisierung 33
2.4.2.3. Klinik 34
2.4.2.4. Staging 34
2.4.2.5. Diagnostische Immunhistochemie 36
2.4.3. Probengewinnung 38
2.4.4. Histopathologische Evaluation 38
2.5. RNA-Extraktion 39
2.5.1. Isolierung von RNA aus Zellkulturen (RNeasy Mini Kit) 39
2.5.2. RNA-Isolierung mittels Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode 40
2.5.3. Vermeidung von RNAse-Kontamination 41
2.6. Reverse Transkription 42
2.6.1. Methodische Grundlagen 42
2.6.2. Praktische Durchführung 42
2.7. Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR) 43
2.7.1. Methodische Grundlagen 43
2.7.2. Primer- und Probe-Design 44
2.7.3. Praktische Durchführung 46
2.7.4. Quantifizierung 46
2.8. Immunhistochemie und ihre Auswertung 47
2.8.1. methodische Grundlagen 47
2.8.2. VMAT-1 48
2.8.3. LYVE-1 50
2.8.4. Automatisierte CD-31-und MIB-1-Färbung 51
2.8.5. KI-67-Index 52
2.8.6. Bestimmung der Gefäßdichte 53
2.9. Statistische Auswertung 53

3. Ergebnisse 54
3.1. Bestimmung des Ki-67 Indexes zur Graduierung des Primars 54
3.2. VMAT-1 als Marker für ileale Karzinoide 55
3.2.1. VMAT-1-m-RNA-Expression 55
3.2.2. Immunhistochemische VMAT-1-Färbung 56
3.3. Auswertung klinischer und histopathologischer Daten 57
3.4. Vergleich der Expressionsprofile 60
3.4.1. Gesamtgruppe 60
3.4.2. Subgruppenanalyse der Tumore mit hepatischer Filialisierung 62
3.4.3. Korrelation der untersuchten Parameter 64
3.5. Korrelation der Expression mit klinisch-histopathologischen Daten 66
3.5.1. Subgruppenanalyse nach Metastasierungsstatus 66
3.5.2. Subgruppenanalyse nach maximalem Tumordurchmesser 67
3.5.3. Subgruppenanalyse nach T-Stadium 69
3.5.4. Analysen unter weiteren klinisch-pathologischen Aspekten 69
3.6. Mikrovaskuläre Dichte 70
3.6.1. Immunhistochemie, über CD-31 zur MVD 70
3.6.2. Klinisch-histopathologische Subgruppenanalysen der MVD 71
3.6.3. Korrelation der MVD mit Expressionsdaten 72
3.7. Lymphgefäßdichte 73
3.7.1. Immunhistochemie, über LYVE-1 zur ITL und PTL 73
3.7.2. klinisch-histopathologische Parameter und die Lymphgefäßdichte 74
3.7.3. Korrelation der Lymphgefäßdichte mit Expressionsdaten 75
3.7.3.1. Intratumorale Lymphgefäßdichte und die VEGF-Familie 76
3.7.3.2. Peritumorale Lymphgefäßdichte und Expressionsdaten 77
3.8. Überlebenszeitanalysen 78
3.8.1. Einfluss klinischer und histopathologischer Parameter 78
3.8.2. Zusammenhang der Expressionsprofile mit der Überlebenszeit 79
3.8.3. Auswirkungen der Gefäßdichte auf die Überlebenszeit 81
3.9. Zelllinien 81
3.9.1. Expressionsprofile 82
3.9.2. BON-6 und Ileumkarzinoide 84
4. Diskussion 85
4.1. VMAT-1, Tumorgröße, Metastasierung und KI-67 als diagnostische und prognostische Parameter 85
4.2. Matrixmetalloproteinasen und ihre endogenen Inhibitoren 93
4.2.1. MMP-2, MMP-9, MMP-11 und MMP-13 93
4.2.2. TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3 106
4.3. Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren 116
4.3.1. VEGF-Rezeptoren 117
4.3.2. VEGF-Liganden 128
4.4. Angiogenese 142
4.5. Lymphangiogenese 148
4.6. Einflussfaktoren auf die Lebenserwartung 155
4.7. Therapeutische Optionen 157
4.8. Expressionsverlust mit Karzinoidprogress und mögliche Ursachen 165
5. Zusammenfassung 169
Geräte, Verbrauchsmaterialien und Herstellerfimen 173
Literaturverzeichnis 176
Danksagung 199

Abkürzungsverzeichnis

^{177}Lu	Lutetium-177	radioakiver Beta-Strahler
5-HT	Hydroxytryptamin	Serotonin
^{90}Y	Yttrium-90	radioakiver Beta-Strahler
ABC	Avidin-Biotin-Complex	
ACTH	adrenocorticotrophisches Hormon	
ADAM	A Disintegrin and Metalloprotease	Metalloproteinase
ADAMTS	A Disintegrin and Metalloprotease with Thrombospondin-like repeats	Metalloproteinase/Aggrekanase
AKT	Proteinkinase B	Teil der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade
AP	alkalische Phosphatase	
AS	Aminosäure	
bp	Basenpaare	
CD	cluster of differentiation	
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cg	Chromogranin	Bestandteil von Sekretgranula
Ct	Tresholde Cycle	PCR-Zyklenzahl
CTGF	connective tissue growth factor	Komplexbildner mit VEGF-A
DAB	3,3Diaminobenzidin	Chromogen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Basismedium zur Zellkultur
DMSO	Dimethylsulfoxid	
dNTP	Desoxyribonukleotid	
EC	enterochromaffin	
ECM	extracellular matrix	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	
EGFR	epidermal growth factor receptor	Wachstumsfaktorrezeptor
EMT	epithelial to mesenchymal transition	Übergang von epithelialer zu mesenchymaler Zelldifferenzierung
ENETS	European Neuroendocrine Tumour Society	
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase oder MAPK	Teil der PLC-Ras-MAPK-Signalkaskade
FBS	fötales bovines Serum	
FFPE	Formalin fixiert in Paraffin eingebettet	
FGF	fibroblast growth factor	Wachstumsfaktor
FGFR	fibroblast growth factor receptor	Wachstumsfaktorrezeptor
Flk-1	fetal liver kinase 1	VEGFR-2 (Maus)
Flt-1	fms-like tyrosine kinase 1	VEGFR-1
Flt-4	fms-like tyrosine kinase 4	VEGFR-3
FRET	Fluoreszenz–Resonanz–Energie–Transfer	
G	Tumorgrad	
g	Erdbeschleunigung	
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	Housekeeping-Gen
GEP	gastroenteropankreatisch	

GIST	gastrointestinaler Stromatumor	
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution	
HCC	hepatocellular carcinoma	Leberzellkarzinom
HCG	humanes Chroiongonadotropin	
HCl	Chlorwasserstoff	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin	
HFM	hepatische Fernmetastase	
HGF	hepatocyte growth factor	Wachstumsfaktor
HIES	Hydroxyindolessigsäure	Serotoninmetabolit
HNSCC	squamous cell carcinoma of the head and neck	Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Nackenbereichs
HRP	Horse-Radish-Peroxidase	
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell	Endothelzelle der Nabelschnurvene
IGF	insulin-like growth faktor	Wachstumsfaktor
IGFR	insulin-like growth faktor receptor	Wachstumsfaktorrezeptor
IHC	Immunhistochemie	Färbemethode
IL	Interleukin	Zytokin
ITL	intratumorale Lymphgefäßdichte	
JÜL	x-Jahres-Überlebensrate	
KDR	kinase insert domain containing receptor	VEGFR-2 (human)
KI-67	Markerprotein für Proliferation	
KK	Korrelationskoeffizient	
LEC	lymphatic endothelial cell	Lymphendothelzelle
lg	Immunglobulin	
LKM	Lympknotenmetastase	
LVD	lymphatisch vaskuläre Dichte	
LYVE-1	lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1	Lymphgefäßmarker
MAPK	Mitogen-aktivierten Kinase oder ERK	Teil der PLC-Ras-MAPK-Signalkaskade
MIB-1	Epitop des KI-67-Proteins	
MIBG	Meta-Iodobenzylguanidin	
Min.	Minute(n)	
MMP	Matrixmetalloproteinase	
MMPI	synthetischer MMP-Inhibitor	
mRNA	messenger RNA	
M-Stadium	Status der Fernmetastasierung	M0 Tumore ohne Fernmetastase, M1 Tumore mit Fernmetastase
mTOR	mammalian Target of Rapamycin	Teil der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade
Muc	Mukosa	Schleimhaut
MVD	mikrovaskuläre Gefäßdichte	
n	Anzahl	
NaOH	Natriumhydroxid	Natronlauge
NET	neuroendokriner Tumor	
Nrp	Neuropilin	Semaphorinrezeptor
NSCLC	non small cell lung cancer	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
NSE	Neuronen spezifische Enolase	unspezifischer neuroendokriner Marker

N-Stadium	Status der Lymphknotenmetastasierung	
P	probability	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat buffered Saline	Puffer
PCR	polymerase chain reaction	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor	Wachstumsfaktor
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor	Wachstumsfaktorrezeptor
Pen/Strep	Penizillin/Streptomycin	Antibiotika
PFS	progession free survival	progressionsfreie Überlebenszeit
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase	Teil der PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade
PKC	Proteinkinase C	Teil der PLC-Ras-MAPK-Signalkaskade
PLC	Phospholipase C	Teil der PLC-Ras-MAPK-Signalkaskade
PlGF	placental growth factor	Wachstumsfaktor
PP	pankreatisches Polypeptid	
PR	partial response	partielle Regression
PRRT	peptide receptor radionuclide therapy	Paptidrezeptor-Radionuklid-Terapie
PTL	peritumorale Lymphgefäßdichte	
qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkriptase-PCR	
R	Residuum	
Raf	rapidly growing fibrosarcoma/Proteinkinase	Teil der PLC-Ras-MAPK-Signalkaskade
Ras	rat sarcoma/G-Protein	Teil der PLC-Ras-MAPK-Signalkaskade
rel.	relativ	
RNA	Ribonukleinsäure	
RT	Raumtemperatur	
S.	Seite	
SCLC	small cell lung cancer	kleinzelliges Lungenkarzinom
Sek.	Sekunde(n)	
SEM	standard error of means	Standardfehler
SIRT	selektive interne Radio-Therapie	
Src	Kinase	Teil der PLC-Ras-MAPK-Signalkaskade
SSA	Somatostatin-Analoga	
Std.	Stunde(n)	
sVEGFR	soluble VEGFR	lösliche Rezeptorisoform
TIMP	tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases	endogender MMP-Inhibitor
T_m	Annealingtemperatur	
TNF	tumor necrosis factor	Tumornekrosefaktor
TNM	Tumor Node Metastasis	Tumorstadieneinteilung nach Invasionstiefe, Lymphknoten- und Fernmetastasen
T-Stadium	Einteilung nach Invasionstiefe des Tumors	
Tu	Primärtumor	
VEGF	vascular endothelial growth factor	vaskulärer Wachstumsfaktor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor	Wachstumsfaktorrezeptor
VMAT	vesikulärer Monoamintransporter	SLC18A

1. Einleitung

Das Karzinoid des terminalen Ileums ist ein langsam wachsender, neuroendokriner Tumor mit Ursprung in den Serotonin produzierenden enterochromaffinen (EC) Zellen des Dünndarms [578]. Aufgrund seiner Lokalisation und seiner späten symptomatischen Manifestation wird es meist nur zufällig oder in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Die Inzidenz und Prävalenz dieser sehr seltenen Tumorentität hat in den vergangenen 30 Jahren deutlich zugenommen, allerdings sind die Kenntnisse über ihre Zellbiologie und Regulationsmechanismen begrenzt und die Möglichkeiten zur gezielten Behandlung und Heilung der Ileumkarzinoide noch immer insuffizient [317]. Trotz der Indolenz dieser Tumore werden die meisten der Patienten ein fortgeschrittenes Karzinoid nicht überleben [551].

1.1. Das Karzinoid des Ileums

Langhans, Lubarsch und Ransom beschrieben Ende des 19. Jahrhunderts als erstes untypische Tumoren des Dünndarms und Siegfried Oberndorfer prägte 1907 den Begriff „Karzinoide“ für karzinom-ähnliche Tumoren, die sich weniger aggressiv als die klassischen gastrointestinalen Adenokarzinome zeigten [318;578]. Sie gehören zu der heterogenen Klasse der gastroenteropankreatischen (GEP) neuroendokrinen Tumore (NET), die dem diffusen neuroendokrinen System entstammen [62]. Im Pankreas, Bronchopulmonalsystem und Gastrointestinaltrakt können über 15 neuroendokrine Zelltypen unterschieden werden, die unterschiedliche Hormone produzieren [242]. Der Darm bildet dabei das größte endokrine Organ des Körpers [5]. Daraus ergibt sich für die NET ein breites histopathologisches Spektrum bezüglich der klinischen Manifestation, der anatomischen Lokalisation, des biologischen Verhaltens, der Hormonproduktion, der Morphologie und des Immunphänotyps [62;274]. Somit bilden sie eher eine Gruppe verwandter Neoplasmen als eine einzelne pathologische Einheit, deren enorme Variabilität zu einer Vielzahl von Klassifizierungssystemen und beachtlichen diagnostischen Verwirrung führte [274]. Williams und Sandler teilten die Karzinoide nach ihrem embryonalen Ursprung in die anatomischen Regionen Vorderdarm (Bronchopulmonalsystem, Magen, Pankreas, Duodenum), Mitteldarm (Jejunum, Ileum, Appendix, Kolon ascendenz) und Hinterdarm (restliches Kolon, Rektum) ein [167;274;431]. Trotz starker Vereinfachung erwies sich diese

Klassifizierung als geeignet, da in jeder dieser anatomischen Regionen Karzinoide mit typischen klinischen, pathologischen und radiologischen Eigenschaften wachsen [274]. Andere Nomenklaturen orientieren sich nach ihrer Funktionalität oder ihrem Zellursprung. In der WHO-Klassifikation (World Health Organization) von 2000 wurden schließlich rein endokrine Tumoren von gemischt endokrin-exokrinen Tumoren unterschieden und nach Differenzierung und Malignität in gut-differenzierte neuroendokrine Tumore, gut-differenzierte neuroendokrine Karzinome und schlecht-differenzierte endokrine Karzinome mit hoch malignem Verhalten aufgeteilt [241;379]. Die gut-differenzierten und langsam wachsenden neuroendokrinen Tumore und Karzinome bilden die Gruppe der „Karzinoide“ und werden anhand ihrer Lokalisation, Morphologie und Funktionalität charakterisiert [241;346]. Die European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) unterschied 2006 in ihren Leitlinien zur Therapie und Diagnostik gastrointestinale neuroendokrine Tumore des Pankreas, des Magens, des Duodenums inklusive des proximalen Jejunums, des Ileums inklusive des distalen Jejunums, der Appendix und des Kolons inklusive des Rektums aufgrund ihres divergierenden klinischen und histopathologischen Verhaltens von einander [346;410;411].

Epidemiologie

Neuroendokrine Tumore bilden 0,49-0,80% aller Malignome und sind meist im Gastrointestinaltrakt (circa 66%) oder Bronchopulmonalsystem (circa 25%) lokalisiert [316;547;578]. 41,8% der gastrointestinalen Karzinoide stammen aus dem Dünndarm und stellen dort den häufigsten Malignomtyp (44%) vor den Adenokarzinomen (24%) [316]. Da Karzinoide im Ileum, vor allem dem terminalen Teil, viel häufiger entstehen als im Jejunum, machen sie 70-90% der Dünndarmkarzinoide und etwa 20% aller Karzinoide aus [57;158;346]. Es gibt allerdings Autopsiestudien, die durch die große Anzahl zufälliger, meist im Dünndarm lokalisierter Befunde, den Anteil der NET an allen Malignomen auf etwa 1% erhöhen [578].

Ileumkarzinoide treten mit einer Häufigkeit von mindestens 0,41 Fällen pro 100.000 Einwohner auf [158;346]. Aufgrund verbesserter Diagnostik und Aufmerksamkeit ist die Inzidenz der Dünndarmkarzinoide seit 1973 von etwa 0,2 auf etwa 0,9/100.000 und für alle NET zusammen von 1,09 auf 2 bis 5,25 Fälle pro 100.000 Einwohner signifikant gestiegen [171;316;547;578]. Das Durchschnittsalter der Patienten liegt zum Zeitpunkt der Diagnose eines Ileumkarzinoids bei 61 bis 65 Jahren [57;316;493].

Äthiologie

Über die Äthiologie der überwiegend sporadisch entstehenden Karzinoide ist wenig bekannt [578]. Neuroendokrine Tumoren des distalen Jejunums und Ileums sind überaus selten mit einer hereditären Erkrankung assoziiert [242]. Eine familiär vererbte Form der Mitteldarmkarzinoide wurde erst fünf mal beschrieben [272] und auch die autosomal dominant vererbte multiple endokrine Neoplasie Typ-1 (MEN-1) wird, im Gegensatz zu Karzinoiden des Vorderdarms, kaum mit ihnen in Verbindung gebracht [287;346].
Allerdings besteht bei Ileumkarzinoiden im Gegensatz zu anderen NET häufig ein weitgehender oder vollständiger Verlust des Chromosoms 18 [257;520]. Rarer sind dagegen Verluste auf den Chromosomarmen 9p, 11q und 16q. Sequenzgewinne, die im Vergleich zu anderen Malignomen selten auftreten, betreffen die Chromosome 4, 7, 5, 20 und den Arm 14q [257;272;520]. Eine relativ häufig betroffene fokale Region auf Chromosomarm 14q beinhaltet beispielsweise das Gen des anti-apoptotischen Proteins DAD1, dessen Expression in den Karzinoiden auch nachgewiesen wird [257].

Mögliche Risikofaktoren für Dünndarmkarzinoide wurden erst kürzlich näher untersucht. Eine Assoziation mit dem Rauchen oder Diabetes mellitus wurden dabei ausgeschlossen [167;520]. Eindeutig häufiger entstehen Dünndarmkarzinoide bei einer familiären Vorgeschichte mit Karzinoid- oder anderen Karzinomerkrankungen, bei Afroamerikanern gegenüber Kaukasiern und bei normalgewichtigen gegenüber übergewichtigen Personen [99;167;181;316;346]. Widersprüchliche Angaben bestehen bezüglich des Geschlechts, Alters und Alkoholkonsums [99;167;170;316;346;520;547].

Zellbiologie

Neuroendokrine Zellen treten über die gesamte Länge des Gastrointestinaltrakts auf und bilden die größte Gruppe hormonproduzierender Zellen im Körper [403], die eine Vielzahl verschiedener bioaktiver Peptide oder Amine sezernieren (siehe Tabelle 1.1) [274;317;346;578]. Entgegen früherer Annahmen entstammen sie nicht der Neuralrinne [539], sondern multipotenten gastrointestinalen Stammzellen [317].

Zelltyp	Lokalisation	Produkt
D	Magen, Duodenum, Jejunum, Kolon, Rektum	Somatostatin
D1	Gastrointestinaltrakt	vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP)
EC	Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon, Rektum	Serotonin, Substanz P, Guanylin, Melatonin, Motilin
ECL	Magen	Histamin
G	Magen, Duodenum	Gastrin
Gr	Gastrointestinaltrakt	Ghrelin
I bzw. CCK	Duodenum, Jejunum	Cholecystokinin, Gastrin, etc
K bzw. GIP	Duodenum, Jejunum	gastroinhibitorisches Peptid (GIP)
L	Dünndarm	Enteroglucagon, Peptid YY, Neuropeptid Y
M	Duodenum, Jejunum	Motilin
N	Dünndarm	Neurotensin
PP	Duodenum	pankreatisches Polypeptid
S	Duodenum, Jejunum	Sekretin
X	Magen	Amylin

Tabelle 1.1: endokrine Zellen des Gastrointestinaltrakts [274;317]

Im Ileum entstehen meist „klassische“ Karzinoide aus enterochromaffinen Zellen [346]. NET aus L- oder N-Zellen sind im Ileum hingegen extrem selten [158;346]. EC-Zellen sind, über die gesamte gastrointestinale Mukosa verstreut, die häufigsten neuroendokrinen Zellen des Körpers [5;157]. Sie fungieren als Sensor und Regulator der Sekretion und der Peristaltik im Gastrointestinaltrakt [157]. Zu ihren Syntheseprodukten gehört unter anderem Serotonin (5-HT = Hydroxytryptamin), das in pleomorphen Sekretgranula gespeichert wird [157]. Bestandteile dieser Vesikel sind beispielsweise Chromogranin-A (Cg), Synaptophysin [317;532] und der für die Serotoninspeicherung essentielle Monoamintransporter VMAT-1 [157].

Histopathologie

EC-Zellkarzinoide bilden die größte Gruppe der intestinalen Karzinoide [346]. Sie sind zwar meist in der Lage mehrere Hormone zu synthetisieren, aber dennoch nur selten funktional [57;314;346]. Gut-differenzierte neuroendokrine Tumore des Ileums und unteren Jejunums präsentieren sich als kleine, ungestielte, festsitzende Knoten [242]. Sie bestehen aus uniformen, mittelgroßen, niedrig proliferierenden Tumorzellen mit nur milder Atypie, die in ein sklerotisches, paucizelläres Stroma eingebettet sind [242;346;379].

Metastasierungsziele der NET sind neben regionalen Lymphknoten (89,9%) vor allem die Leber (44,1%), aber auch die Lunge, das Peritoneum, Pankreas, Skelett und die Haut [317;578]. Dünndarmkarzinoide sind bei der Erstdiagnose nur zu 22-36% lokal begrenzt, 33-44% (in manchen Studien bis zu 85%) weisen bereits Metastasen in regionalen Lymphknoten auf und 22-44% Fernmetastasen. Im Gegensatz dazu sind die Metastasierungsraten bei der Gesamtgruppe aller Karzinoide deutlich niedriger (53% lokal begrenzt, 19% N1 und 13% M1) [57;316;346;493;547]. Die Tumorgröße ist dabei kein verlässliches Prognostikum, da Metastasen wenn auch selten (5%) schon bei kleinen Primaren unter einem Zentimeter auftreten können [242;317]. Karzinoide über 2cm Durchmesser sind zu 85% lymphatisch und häufig auch hepatisch filialisiert [242]. Langfristig entwickeln 50-75% der Dünndarmkarzinoide Lebermetastasen [317;493]. Ileumkarzinoide weisen zu 25-35% auch multiple Primare auf [57;346;493]. Dabei ist unklar, ob hier ein Wachstumsfaktor oder initiierendes Ereignis möglicherweise ähnliche Vorläuferzellen an unterschiedlichen Orten beeinflusst [158] oder die multiplen Tumore Metastasen eines einzelnen Primärtumors sind [346]. Bei jejuno-ilealen NET bilden sich in 18-34% der Fälle synchrone oder metachrone Zweitmalignome, dabei vor allem Adenokarzinome des Kolons [57;158;316;346]. Möglicherweise wird dieses Phänomen durch den Einfluss der Wachstumsfaktoren, die von den neuroendokrinen Tumoren sezerniert werden, ausgelöst [316]. Eine weitere typische Eigenschaft neuroendokriner intestinaler Tumore ist das Auftreten von Fibrosierung und Gewebevernarbung, die zu Obstruktion und Infarkten führen [346].

Klinik

Ileumkarzinoide werden aufgrund ihrer Lokation und ihres langsamen Wachstums meist erst sehr spät symptomatisch [578]. Im Verlauf der Erkrankung leiden viele Patienten zunächst an eher diffusen Symptomen, wie zum Beispiel Meteorismus, intermittierenden Durchfällen, Obstipation und Schwindel, die oft zu Fehldiagnosen wie Allergien oder Reizdarmsyndrom führen [158]. Sie können allerdings auch bei schon vorhandener Fernmetastasierung bis zur Zufallsdiagnose symptomfrei sein [317]. Deshalb erfolgt die Erstdiagnose im Durchschnitt erst verspätet, nach 5 bis 7 Jahren [317;346], häufig bereits in einem fortgeschrittenen metastasierten Stadium (60 %) [158].

Pathophysiologisch wird die Symptomatik nicht nur durch Massenverdrängung und Invasion des primären Karzinoids und seiner Metastasen verursacht, sondern auch durch massenhafte Ausschüttung von Hormonen und biogenen Aminen, vaskuläre Elastosen und Fibrosierung [314]. Dadurch können sich beispielsweise Darmverschlüsse und –ischämien bis hin zu Mesenterialinfarkten entwickeln [158;317].

Als weiteres Spätsymptom gilt das Karzinoidsyndrom, das durch starke Hormonausschüttung in den großen Kreislauf ausgelöst wird und bei 18%-35% der Dünndarmkarzinoide auftritt [158;224;242;314]. Es ist zumeist gleichbedeutend mit einer hepatischen Metastasierung (95%), da Serotonin und andere Sekretionsprodukte der Karzinoide normalerweise in der Leber abgebaut werden [242]. Leitsymptome des Karzinoidsyndroms sind Flush (70-90%), Diarrhöen (70%), Herzerkrankung (40-50%), abdominale Schmerzen (40%) und Bronchokonstriktion (15%) [158;242]. Dabei treten vor allem Durchfälle und kolikartige Schmerzen auch häufig unabhängig von dem Karzinoidsyndrom auf (44% bzw. 71% der Patienten) [444;493;578]. Bei der Flush-Symptomatik, die sich bei etwa 24% aller Patienten mit einem Ileumkarzinoid zeigt [493], entwickelt sich ein minuten- bis tagelang andauerndes Erythem mit Hitzewallungen, Tachykardie und Schweißausbrüchen [158;242;444]. Auslöser können Stress, Alkoholkonsum und Kompression der Bauchorgane sein [158]. Etwa 10-20% der Patienten mit einem Karzinoid entwickeln im Durchschnitt 1,5 Jahre nach Diagnosestellung ein Hedinger-Syndrom. Diese fibröse endokardiale Verdickung im rechten Herzen, die zu einer Schädigung der Trikuspidal- und Pulmonalklappe, sowie einer verminderten rechtsventrikulären Funktion führt, bildet eine häufige Todesursache (30-50%) [112;317;320;578] und ist die zweit häufigste Ursache für eine Trikuspidalstenose [444]. Zusätzliche mögliche Symptome des Karzinoidsyndroms sind Gesichtsödeme, Arthro- und Myopathien, sowie im weiteren Verlauf Teleangiektasien und pellagraartige Hautveränderungen [143;172;408].

Die Karzinoidkrise mit exzessiver Freisetzung vasoaktiver Substanzen in den Kreislauf ist eine potentiell lebensbedrohliche Komplikation mit schwerer Flush-Symptomatik, Diarrhö, Dehydration, Hypotonus und Arrhythmien [578]. Im Verlauf der Karzinoiderkrankung kann es zudem zu Gewichtsverlusten (2-24%) und gastrointestinalen Blutungen (4-24%) kommen [346].

Diagnostik

Auch die Diagnostik von Ileumkarzinoiden ist durch die späte Symptommanifestation und die Lokalisation erschwert [317]. Wie bei jedem malignen Geschehen sind die Lokalisierung und Stadieneinteilung des Primärtumors entscheidend für das weitere Vorgehen. Hierbei müssen teilweise verschiedenste bildgebende Verfahren kombiniert werden, um kleine biochemisch gesicherte Tumoren zu finden. Zur Anwendung kommen Endosonographie, konventionelle Radiologie, wie Spiral-CT (Computertomographie) und MRT (Magnet-Resonanz-Tomographie) inklusive MRCP (Cholangiopankreatikographie) und MRT-Angio, selektive Angiologie, teilweise mit Hormonsampling und endoskopische Techniken, wie Kapselendoskopie, Fieberoptikverfahren und Doppelballon-Enteroskopie [158;317]. Zusätzlich stehen nukleare Bildgebungsverfahren, wie die MIBG- (Meta-Iodobenzylguanidin) und Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie (SRS) zur Verfügung. Die SRS ist dabei mit einer 84%igen Spezifität überlegen und bietet gleichzeitig auch Hinweis auf Therapieoptionen [158;317;578]. Eine Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit FDG (Fluordesoxyglukose) ist aufgrund der niedrigen metabolischen Aktivität der Karzinoide obsolet, allerdings führt eine PET mit 5-HT zu einer 95%ig spezifischen Detektion der NET [158;578]. In Kombination wird so eine zu über 96% sensitive Diagnostik erreicht [158]. Dennoch können kleine Primare und Lebermetastasen (< 0,5cm) übersehen werden [317].

Bei der biochemischen Diagnostik gastrointerstinaler neuroendokriner Tumore wird eine Reihe Marker unterschiedlicher Spezifität eingesetzt. Der spezifischste, aber mäßig sensitive Marker für funktionelle EC-Zellkarzinoide ist dabei der Serotoninmetabolit 5-Hydroxyindolessigsäure (HIES) im 24h-Urin, der zudem mit einer schlechten Prognose assoziiert ist [92;158;578]. Im Plasma dient beispielsweise Chromogranin-A als allgemeiner Marker für neuroendokrine Tumore, da es bei 60-80% aller NET des gastrointestinalen Trakts, inklusive der nicht-funktionellen Tumore, erhöht ist [158;578]. Seine Sensitivität liegt bei 99% und korreliert mit der Tumormasse des Ileumkarzinoids, allerdings ist seine Spezifität aufgrund seiner Assoziation zu anderen Karzinomen nicht groß [158;172;578]. Alternative allgemeine Marker sind z.B. Neuronen spezifische Enolase (NSE), pankreatisches Polypeptid (PP) und Alkalische Phosphatase (AP) [92;317]. Spezifische Marker für GEP-NET bilden unter anderem Serotonin und Substanz P, mit deren Hilfe die Funktionalität jejuno-ilealer Karzinoide festgestellt werden kann [158;317]. AP und Neurokinin A sollen bessere prognostische

Aussagekraft besitzen als Cg-A [158]. α- und β-HCG weisen dagegen sehr geringe Spezifität auf, können allerdings auf einen maligneren Phänotyp hinweisen [317;466].

Zur histopathologischen Diagnostik von EC-Zellkarzinoiden wurde historisch mittels Silberimprägnation die typische argentaffine Eigenschaft von EC-Zellen genutzt [274;346]. Zudem wird die Präsenz von sekretorischen Granula in Tumorzellen als Beweis einer neuroendokrinen Differenzierung angesehen [201]. Eine aktuelle Leitlinie der ENETS empfiehlt jedoch zur Diagnostik eines jejuno-ilealen neuroendokrinen Tumors einen immunhistochemischen Nachweis der allgemeinen neuroendokrinen Marker Chromogranin A und Synaptophysin, sowie optional des EC-Zell-spezifischen Serotonins [112]. Eine Bestimmung des Somatostatinrezeptorstatus kann zusätzlich Hinweise auf die mögliche Effektivität einer Therapie mit Somatostatin-Analoga oder Peptidrezeptor-Radionukliden bieten [317]. Seit 2006 existiert auch eine ENETS-Empfehlung hinsichtlich der Evaluation des TNM-Status neuroendokriner Tumore des unteren Jejunums und Ileums [411]. Eine Evaluation des Proliferationsindex KI-67 und konsekutiv des Tumorgrades wird zur weiteren Diagnostik ebenfalls empfohlen [411]. Die Indexwerte der langsam wachsenden Karzinoide sind im Vergleich zu anderen Malignomen zwar sehr niedrig, gelten aber als prognostisch [86;100;493]. Davon abgesehen fehlen sensitive und spezifische Marker, die das Tumorwachstum und –verhalten vorhersagen [317].

Therapie

Chirurgische Entfernung des Primärtumors und der regionalen Lymphknoten gilt weiterhin als einzig mögliche kurative Therapie für Karzinoide [63;317]. Kurative Chirurgie, nach der keine medikamentöse Therapie indiziert ist, wird bei Patienten mit lokal begrenzten, jejuno-ilealen Karzinoiden mit weitläufiger Lymphadenektomie und unter Abschirmung mit Somatostatin-Analoga zur Vermeidung einer Karzinoidkrise durchgeführt [112]. Eine zytoreduktive palliative Operation (Tumordebulking) zur Verlängerung der Überlebenszeit sollte bei fortgeschrittenen jejuno-ilealen Karzinoiden erwogen werden [112;158]. Bei hepatischer Filialisierung (50-70%) kann so die 5-Jahresüberlebensrate von 30% auf über 61% gesteigert werden [112;493]. Zudem können durch die Reduktion der Tumormasse Obstruktionen und Infarkte verhindert und die Symptomatik gelindert werden [112]. Nachuntersuchungen in Intervallen von 6 bis 12 Monaten sollten lebenslang erfolgen [112].

Zusätzlich bieten Lebertransplantationen bei ausgewählten Patienten einen kurativen Ansatz [503]. Alternativ werden zur zytoreduktiven Behandlung von Lebermetastasen auch Chemoembolisation, Kryo- und Radiofrequenzablation eingesetzt [158;415]. Diese Techniken zeigen bei 60-80% der Patienten einen systemischen Erfolg, sind aber immer mit Rezidiven verbunden [578]. Eine vielversprechende, innovative Alternative zur Behandlung von inoperablen hepatischen Metastasen bietet auch die SIRT (Selektive interne Radio-Therapie). Sie ermöglicht durch Applikation mit dem Beta-Strahler Yttrium-90 (^{90}Y) beladener Resin-Mikrosphären die gezielte Radioembolisation von Leberarterien [238;239;259] und verbessert palliativ die Symptomatik und Prognose weit fortgeschrittener, hepatisch filialisierter NET mit einer partiellen Zytoreduktion bei 32-66%, sowie einer kompletten Regression bei 2,7-18% der Patienten [223;236;239].

Die Zielsetzung medikamentöser Behandlung kann zum einen in einer Symptomreduktion, zum anderen auch in der Hemmung des Tumorwachstums bzw. der Metastasierung oder in einer Tumorreduktion liegen [317]. Verschiedenste Chemotherapeutika alleine oder in Kombination haben sich allerdings als weitgehend ineffektiv zur Suppression des Wachstums und der Streuung von Karzinoiden erwiesen [317]. Dennoch kommen bei metastasierten und inoperablen Tumoren palliative Chemotherapien z.B. mit Streptozotozin und 5-FU, zum Einsatz [172;317]. Laut ENETS-Leitlinie wird eine Chemotherapie aber nur bei schlecht-differenzierten NET empfohlen [112].

Somatostatin-Analoga (SSA) vermindern effektiv die Karzinoidsymptomatik [112;317;372]. Sie werden bei über 80% der Ileumkarzinoidpatienten, größtenteils mit funktionalen Tumoren, angewandt [493]. Ihre Wirksamkeit ist abhängig von der Expression von Somatostatinrezeptoren auf den Tumorzellen, die bei 85-90% der GEP-NET vorhanden ist [372]. Zum Einsatz kommen, auch im Falle einer Karzinoidkrise, vor allem Octreotid und Lanreotid [112;372]. Langfristig werden aber Depotpräparate empfohlen [112]. Allerdings kommt es nach einer begrenzten Zeit zu Wirksamkeitsverlusten [112]. Eine anti-proliferative Wirkung ist nur schwach ausgeprägt, mit partiellen oder kompletten Regressionsraten unter 5% [317;372]. Allerdings kann eine Stabilisierung der Erkrankung bei 24-57% der Patienten mit jejuno-ilealen Karzinoiden für durchschnittlich bis zu 4 Jahre eintreten [112;317;372]. Ein Einfluss auf die Überlebenszeit ist jedoch für Ileumkarzinoide fraglich [493;547].

Eine zusätzliche Behandlungsmöglichkeit bietet die Gabe von Interferonen. Sie bewirken eine Tumorreduktion bei 10-15% der Patienten, die Dauer des Effektes liegt zwischen 12 und 26 Monaten, und haben eine hohe symptomatische Ansprechrate von 50 bis 80% [112;317]. Allerdings werden sie aufgrund ihrer starken Nebenwirkungen, wie z.B. grippeartigen Symptomen und Depressionen, entsprechend der ENETS-Leitline eher als „second-line“-Medikamente genutzt [112;372].

Die Effektivität einer Kombination von Somatostatin-Analoga und Interferon ist umstritten [112]. Studien konnten keine Steigerung der Tumorregression feststellen, dafür aber eine Verbesserung der Prognose [317;372]. Eine Kombination von Chemotherapeutika mit Interferon hat keinen positiven Effekt [578]. Allerdings senkt eine Kombination mit Somatostatin-Analoga die Progression und erhöht das mediane Überleben bei Karzinoidpatienten im Vergleich zur Monotherapie mit SSA [247].

Eine weitere Option, mit symptomatischen Verbesserungen in etwa 60% der Fälle für median 4-5 Monate, bietet radiogelabeltes MIBG (Meta-Iodobenzylguanidin), ein biogenes Amin ähnlich dem Noradrenalin, das von chromaffinen Zellen aufgenommen werden kann. Allerdings ist teilweise seine Aufnahme in die Tumore begrenzt [578]. Rein symptomatisch wirken z.B. Serotoninantagonisten wie Methysergid und Cyproheptadin [172].

Viel sicherer und effektiver, allerdings nur in wenigen Zentren durchführbar, ist die Peptidrezeptor-Radionuklid-Therapie (PRRT) mit mittels des DOTA-Chelators radiogelabelten SSA [112;132;254]. Sie wird bei inoperablen, medikamentenrefraktären, symptomatischen Tumoren, die Somatostatinrezeptoren exprimieren, empfohlen [112]. Dabei werden meist Beta-Partikel, wie das hoch energetische und weit strahlende Yttrium-90 (^{90}Y) und das kürzer strahlende Lutetium-177 (^{177}Lu), verwendet [254;578]. Phase I–II Studien zeigen für ^{90}Y-DOTA-Octreotid (Edotreotid, DOTATOC), ^{90}Y-DOTA-Lanreotid, ^{90}Y-DOTA-Octreotat (Lutate) und ^{177}Lu–DOTATATE bei fortgeschrittenen Karzinoiden eine symptomatische Besserung, eine Stabilisierung der Erkrankung in 28–56% und eine partielle Tumorreduktion in 12–35% der Fälle [112;254]. Die Nebenwirkungen der PRRT scheinen bei normaler Dosierung relativ gering, bei Überschreitung einer Schwellendosis allerdings nieren- und myelotoxisch zu sein [112;578]. Der Vergleich des Nutzens von Chemotherapie, SS-Analoga mit oder ohne

Interferonkombination und ^{177}Lu–DOTATATE zeigt hinsichtlich der Tumorreduktion keinen großen Unterschied, allerdings eine deutliche Verlängerung der progressionsfreien Zeit und der medianen Überlebenszeit durch den Einsatz der Radionuklide [254]. Die Therapie mit ^{177}Lu–DOTATATE verlängert dabei die mediane Überlebenszeit bei gastroenteropankreatischen neuroendokrinen Tumoren gegenüber 6 Jahren mit systemischer Behandlung auf 10,5 Jahre [254].

Insgesamt sind die therapeutischen Optionen für fortgeschrittene neuroendokrine Tumore noch immer begrenzt [551]. Es gibt allerdings einige neue Therapieansätze, die auf verschiedene Wachstumsfaktoren, ihre Rezeptoren und die anschließenden Signalwege (z.B. EGFR, IGF-1-R, PI3Kinase, AKT, mTOR) abzielen [317]. Sie werden derzeit in klinischen Studien getestet und wirken meist anti-angiogen [317]. Zu diesen Substanzen zählen z.B. der EGFR-Inhibitor Gefitinib, eine Kombination von Temozolomid und Thalidomid, das anti-angiogene Endostatin, der CD56-Inhibitor BB-10901, der monoklonale VEGF-Antikörper Bevacizumab, die Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib, Sunitinib, Sorafenib, Vatalanib und Pazopanib, sowie die m-TOR-Inhibitoren (mammalian Target of Rapamycin) Sirolimus, Temsirolimus und Everolimus [104;158;258;317;549;551]. Allerdings wird bei weit weniger als 20% der mit diesen Hemmstoffen behandelten Patienten eine radiologische Regression beobachtet [317].

Prognostik

Die mediane Überlebenszeit von Patienten mit einem jejuno-ilealen Karzinoid beträgt 88 Monate [547]. Dabei haben sie in den meisten Studien mit einer 5-Jahres-Überlebens-Rate (JÜL) von 55-68% [57;158;172;316;436] im Vergleich eine schlechtere Prognose als die meisten anderen Karzinoide [547]. Beispielsweise liegt die 5-JÜL mit Karzinoiden der Appendix bei 71-95%, der Lunge bei 74-80%, des Magens bei 63%, des Kolons bei 62-75% und des Rektums bei 62-88 % [316;436;578]. Allerdings erbrachte eine jüngere Studie bei ilealen Karzinoiden eine 5-JÜL von 79% [493]. Dabei ist jedoch unklar, ob dies auf einer früheren Diagnosestellung durch verbesserte Technik und erhöhte Aufmerksamkeit oder einer therapeutisch verlängerten absoluten Überlebenszeit gründet [493;547].

Als Faktoren, die die Lebenserwartung von Patienten mit jejuno-ilealen Karzinoiden negativ beeinflussen, gelten: ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium bei Diagnose, Fernmetastasen, ein Karzinoidsyndrom bei Erstdiagnose, Flush-Symptomatik, Gewichtsverlust, eine größere Invasionstiefe des Primars, eine höhere mitotische Rate, ein KI-67-Index > 2% (bzw. >1% [86]), ein solides, nicht-organoides gegenüber einem insulär-glandulären Wachstumsmuster, keine chirurgische Tumorreduktion gegenüber sowohl radikaler als auch palliativer Operation und eine hormonelle Funktionalität des Tumors [57;112;158;346;493]. Zusätzlich sind in gastrointestinalen Karzinoiden die Tumorinfiltration benachbarter Organe, ein erhöhter HIES-Spiegel im 24-Std.-Urin, ein erhöhter Cg-A-Spiegel im Serum, eine stärkere Angioinvasion, eine höhere Tumorlast und eine negative Somatostatinrezeptor-Szintigraphie prognostisch ungünstig [242;317;417]. Keine Relevanz für das Gesamtüberleben besitzen Zufallsdiagnose, abdominaler Schmerz und Diarrhöe [493]. Kontrovers sind die Daten zum Einfluss des Geschlechts, Alters bei Erstdiagnose, eines multiplen Primars, größeren Tumordurchmessers, Hedinger-Syndroms, der Gabe von Somatostatin-Analoga und der lymphatischen Metastasierung [57;158;346;417;436;493;547].

Dabei liegen die 3-, 5- und 10-JÜL-Raten in jejuno-ilealen Karzinoiden im Falle einer lokal begrenzten Erkrankung bei 73%, 60-77% und 49% mit einer medianen Überlebenszeit von 115 Monaten, einer Metastasierung in regionale Lymphknoten bei 83%, 73-75% und 46% mit einer medianen Überlebenszeit von 107 Monaten und im Falle einer Fernmetastasierung bei 70%, 18-54% und 15-30% mit einer medianen Überlebenszeit von 65 Monaten [158;316;346;547]. Dabei scheint anhand der JÜL-Daten eine lokal begrenzte Erkrankung kaum Überlebensvorteile gegenüber einem regional metastasierten Karzinoid zu bieten. Die Prognose von Patienten mit fernmetastasierten intestinalen Karzinoiden hat sich allerdings in den letzten 30 Jahren dramatisch verbessert [547]. Entsprechend lässt sich heute die 5-JÜL-Rate von 35-48% therapeutisch auf über 69% erhöhen [346]. Insgesamt sind nach 25 Jahren jedoch nur 23% der Patienten mit jejuno-ilealen Karzinoiden gesund [112]. Somit werden die meisten Betroffenen, trotz der langsamen Progression der neuroendokrinen Tumore, von einer fortgeschrittenen Erkrankung nicht genesen [551].

1.2. Untersuchungsschwerpunkte

Die Kenntnisse über die Tumorbiologie ilealer Karzinoide sind nach wie vor gering und die vorhandenen Therapieansätze können, abgesehen von chirurgischen Eingriffen, die Lebenserwartung der Patienten nur wenig beeinflussen. Wachstum und Metastasierung eines Karzinoms werden im Allgemeinen durch fundamentale Veränderungen der Zellphysiologie ermöglicht. Dazu zählen autokrine Stimulation durch Wachstumsfaktoren, Desensibilisierung gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Umgehung der Apoptose, uneingeschränkte Replikationsfähigkeit, Angiogenese, Gewebsinvasion und Ausstreuung [105]. Dabei ist eine Vielzahl biologisch aktiver Proteinfamilien involviert. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei von ihnen näher untersucht, um die Fragestellung nach Tumorbiologie, Metastasierungswegen und somit nach möglichen Ansätzen für neue Therapien und prognostische Diagnostik zu ergründen. Zum einen befasst sich die Studie mit ausgesuchten Matrixmetalloproteinasen (MMP) und den zugehörigen Inhibitoren (tissue inhibitors of MMPs, TIMP), zum anderen mit der Familie der vaskulären Wachstumsfaktoren (vascular endothelial growth factor, VEGF) sowie ihren Rezeptoren (vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR) und der Assoziation dieser Parameter mit der Angiogenese, Lymphangiogenese und Progression von Ileumkarzinoiden, sowie der Auswirkungen auf die Prognose.

1.2.1. Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren

Matrixmetalloproteinasen bilden eine Familie strukturell eng verwandter, Zink abhängiger Endopeptidasen, die fähig sind Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) zu spalten [334]. Bis heute wurden 26 Mitglieder der Enzymfamilie in Wirbeltieren identifiziert und 23 davon auch im humanen Organismus nachgewiesen [399]. Sie treten in membrangebundener oder gelöster Form auf und wurden entsprechend ihrer Entdeckung durchnummeriert. Nach Substratspezifität, Primärstruktur und Lokalisation werden die MMPs in sechs Untergruppen unterteilt. Diese Gruppen umfassen Kollagenasen (MMP-1, -8, -13, -18), Gelatinasen (MMP-2, -9), Stromelysine (MMP-3, -10), Matrilysine (MMP-7, -26), transmembrane bzw. Gycosylphosphatidylinositol (GPI) verankerte Membrantyp-MMPs (MMP-14, -15, -16, -24 bzw. MMP-17, -25) und „andere“ MMPs (MMP-11, -12, -19, -20, -22, -23, -28) [511].

Der Großteil der Proteinasen, abgesehen von den intrazellulär durch Furin aktivierten Membrantyp-MMPs und MMP-11, -23, und -28, gelangt als Zymogen in den extrazellulären Raum und wird erst dort durch Abspaltung einer pro-Domäne aktiviert. Zusätzlich zu ihren ECM-Substraten können MMPs auch verschiedene zirkulierende Proteine, Zelloberflächenmoleküle und perizelluläre Nicht-Matrixproteine spalten und somit das Zellverhalten auf vielfältige Weise regulieren [459]. Dadurch beeinflussen sie diverse physiologische und pathologische Prozesse [556]. Unter physiologischen Bedingungen sind MMPs z.B. in die Embryonalentwicklung, Ovulation, den Knochenumbau und die Wundheilung einbezogen. Aber sie sind auch in pathologische Vorgänge, wie die rheumatoide Arthritis, Magenulzera und Arteriosklerose, involviert [556]. Zudem haben sie eine entscheidende Rolle bei der Entstehung, dem invasiven Wachstum und der Metastasierung diverser Tumore [185;334]. In normalem gesunden Gewebe sind MMPs allerdings nur in geringen Mengen und meist in latenter Form vorhanden [382], so auch in chromaffinen und anderen neuroendokrinen Zellen, wie z.B. in der Schilddrüse [494].

Beinahe ubiquitär im menschlichen Organismus finden sich dagegen die vier Vertreter der endogenen Gewebsinhibitoren der MMPs (TIMPs, tissue inhibitors of metalloproteinases) [265]. Sie wirken nicht nur hemmend auf die proteolytische Funktion der MMPs, sondern sind teilweise auch in ihre Aktivierung involviert [25]. Das Gleichgewicht der MMPs und TIMPs ist für die Homöostase der ECM sowohl unter physiologischen, als auch unter pathologischen Bedingungen, wie Wundheilung, Gewebeumbau und Angiogenese, und ebenso für die Genese, die Invasion und die Metastasierung von Tumoren essentiell [265]. Allerdings sind auch die TIMPs multifunktionale Proteine, die nicht nur auf MMP-abhängigen, sondern genauso auf MMP-unabhängigen Wegen verschiedenste Prozesse regulieren können [74;206].

Es wurden bereits zahlreiche Studien über die Rolle der MMPs und TIMPs in diversen Karzinomtypen erstellt. Aber bis jetzt gibt es, abgesehen von der Veröffentlichung im Rahmen dieser Arbeit [513], kaum Publikationen zu diesem Thema über gastrointestinale oder pulmonale endokrine Tumore [381;495].

1.2.2. Vaskuläre Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren

Vaskuläre endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) induzieren mittels ihrer Rezeptoren (VEGFR) sowohl unter physiologischen, als auch unter pathologischen Konditionen das Wachstum von Blut- und Lymphgefässen [65;481]. Allerdings wirkt ihre mitogene, chemotaktische und anti-apoptotische Aktivität auch auf diverse Zellen nicht-endothelialen Ursprungs, da eine Expression der VEGF-Rezeptoren weitverbreitet ist und auch viele Tumorzellen betrifft [58;122;468]. Zudem können einige VEGF-Liganden einen Übergang einer epithelialen zu einer mesenchymalen Differenzierung (EMT) von Zellen induzieren [541]. Dementsprechend stimuliert das VEGF-System nicht nur über angiogene und lymphatische Effekte, sondern auch auf autokrinem Weg die Entstehung, Aggressivität und Progression diverser Karzinome mit negativem Einfluss auf die Prognose der Patienten [58;67;90]. Die humane VEGF-Familie besteht aus vier Mitgliedern (VEGF-A, -B, -C, -D), sowie PlGF (placental growth factor), die ihre Wirkung über die Bindung der drei Rezeptoren (VEGFR-1, -2, -3) sowie von Neuropilin-1 und -2 entfalten [439]. VEGF-A ist der am ausführlichsten erforschte Vertreter. Er bindet an VEGFR-1 und -2 und induziert primär über VEGFR-2 vor allem in Blutgefäßen eine starke Endothelzellproliferation [125]. Dagegen konnte die Rolle von VEGF-B und seinem Rezeptor VEGFR-1 bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden [340]. VEGF-C und VEGF-D sind nicht nur an der Angiogenese via VEFGR-2 beteiligt, sondern auch maßgeblich an der Lymphangiogenese, da ihr Hauptrezeptor VEGFR-3 überwiegend auf lymphatischen Endothelzellen exprimiert wird [297;481].

Starke Vaskularisation scheint ein typisches Merkmal ilealer Karzinoide zu sein [431] und einige Studien haben sich mit der Angiogenese und der Expression von VEGF-A, VEGFR-1 und -2 in gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren, sowie teilweise auch mit deren klinischer Relevanz beschäftigt [84;262;392;488;570]. Allerdings befassen sich diese Studien, im Gegensatz zu der im Rahmen dieser Arbeit bereits veröffentlichte Publikation [38], nicht mit den übrigen VEGF-Liganden und –Rezeptoren und betrachten zumeist eine inhomogene Gruppe neuroendokriner Tumore unterschiedlichen Ursprungs.

1.2.3. Angiogenese

Das Gefäßsystem dient zum Transport von überlebensnotwendigen Nährstoffen und Sauerstoff zu den Zellen [67]. Nach Erreichen eines kritischen Durchmessers von 0,2 bis 2 mm, ist die Gefäßentwicklung auch in Tumoren für eine ausreichende Versorgung und weiteres Wachstum unbedingt erforderlich [58;419]. In der Embryogenese dienen Gefäße zusätzlich als Leitstruktur für die Organentwicklung [66]. Zwei Formen des Gefäßwachstums können unterschieden werden: die Vaskulogenese, eine de novo Kreation aus endothelialen Vorläuferzellen, und die Angiogenese, bei der neue Blutgefäße aus vorbestehenden Gefäßen mittels Proliferation reifer Endothelzellen aussprossen [65;419;421]. Zur Quantifizierung der Angiogenese dient die mikrovaskuläre Dichte (MVD) [526].

Die Vielzahl stimulatorischer und inhibitorischer Signale erfordern im komplexen Prozess der Gefäßentwicklung ein fein abgestimmtes Gleichgewicht [66]. VEGF-A gilt als einer der Hauptstimulatoren der Angiogenese, aber auch die restlichen VEGF-Liganden und eine Fülle weiterer Zytokine und Wachstumsfaktoren wirken pro-angiogen [126;421]. Ebenso zahlreich sind die endogenen Hemmstoffe der Angiogenese, wie z.B. Angiostatin oder bioaktive Spaltprodukte der Kollagene [66]. Stimulatoren wie Inhibitoren können von diversen Zellen, wie z.B. Entzündungszellen und Tumorzellen, sezerniert oder aus der ECM freigesetzt werden und wirken entweder direkt oder indirekt auf die Proliferation bzw. Migration von Endothelzellen [421;506]. Gefäßwachstum erfordert auch einen Abbau der ECM durch Proteinasen, wie MMPs [65]. Matrixmetalloproteinasen und TIMPs wirken jedoch auf vielfältige Weise sowohl stimulierend als auch hemmend auf die Angiogenese [105;206;237;353;421;426;456;461;509;511;557]. Im ausgewachsenen Organismus gehen die meisten Blutgefäße in einen Ruhezustand über [66]. Die endotheliale Zellteilungsfähigkeit bleibt jedoch bestehen und kann durch Hypoxie oder Entzündungsprozesse induziert werden [66].

Eine Störung des angiogenen Gleichgewichts führt zu irregulärer Angiogenese und ist mit einer Vielzahl von Erkrankungen verbunden [66]. Bereits in einem frühen Stadium der Karzinogenese beginnt durch einen angiogenen „Switch“ die Tumorangiogenese, ausgelöst durch Entzündungsreaktionen, metabolischen Stress und genetische Mutationen [67;162]. Im Gegensatz zu den streng hierarchisch geordneten, intakten Gefäßen unter physiologischen Bedingungen bilden die dilatierten, asymmetrischen

Tumorgefäße ein wirr geschraubtes, undichtes Gefäßnetz mit einem chaotischen Blutfluss [182;419;421]. Eine hohe Gefäßdichte korreliert dabei in vielen Karzinomen mit einer größeren Malignität und schlechteren Prognose [563]. Die Angiogenese selbst ist allerdings nicht der Auslöser einer malignen Entartung, ermöglicht aber die Progression und Metastasierung von Tumoren [128].

Zum Gefäßwachstum in neuroendokrinen gastrointestinalen Tumoren existieren bereits einige Studien. NET sind typischer Weise sehr gefäßreich [84;551] und scheinen sich in ihrer angiogenen Tumorbiologie von anderen Karzinomen zu unterscheiden. Die MVD kann hier nur selten mit der VEGF-Famile verknüpft werden. Beispielsweise korreliert sie nicht mit VEGF-A im neuroendokrinen Pankreaskarzinom [300;476], sowie nicht mit VEGF-A, VEGFR-1 und VEGFR-2 in EC-Zellkarzinoiden des Ileums, Kolons und der Appendix [262], jedoch positiv mit VEGF-A in einer Karzinoidgruppe gemischten Ursprungs [570]. In neuroendokrinen Pankreaskarzinomen sind Malignität, Invasivität, Tumorwachstum und Metastasierung zudem invers mit der MVD assoziiert und das Gesamtüberleben verbessert sich mit steigender Gefäßzahl [84;300;476;483]. Eine negative Korrelation mit der Malignität findet sich auch bei EC-Zelltumoren [262;392]. Daraus schließen Poncet et al., dass eine hohe Gefäßdichte in neuroendokrinen Tumoren ein indirekter Marker für Differenzierung und prognostisch vorteilhaft ist [392].

1.2.4. Lymphangiogenese

Das Lymphgefäßsystems transportiert die, aufgrund des Blutdrucks, kontinuierlich extravasierte, proteinreiche interstitielle Flüssigkeit, sowie Zellen zurück in die Blutzirkulation [8;11]. Zusätzlich ist das Lymphsystem für die Fettabsorption im Darm erforderlich und durch den Transport von Antigenen und Leukozyten in die körpereigene Immunabwehr eingebunden [383]. Im Gegensatz zu Blutgefäßen weisen die irregulär geformten Lymphkapillaren nur eine einlagige Endothelzellschicht, eine unvollständige Basalmembran und keine Perizyten auf [11]. Lymphendothelzellen (LEC) sind überlappend angeordnet und können bei einem erhöhten Druck auseinander driften [383]. Sie können von Blutendothelzellen unter anderem durch einige spezifische Proteine, wie z.B. LYVE-1 oder Podoplanin, immunhistochemisch unterschieden werden [8;383;500]. Elastische Fasern verhindern ein Kollabieren der Lymphgefäßwände bei Änderung des interstitiellen Drucks durch Verankerung in die ECM [473;500].

Als Hauptvermittler der Lymphangiogenese gilt die VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3-Achse, die das Wachstum, die Migration und das Überleben von lymphatischen Endothelzellen stimuliert [473]. Allerdings finden sich auf der Oberfläche der LECs auch die Rezeptoren VEGFR-2, Nrp2, FGFR, IGFR-1, C-MET, TIE-2, PDGFR-α und -β, die ebenfalls Proliferation vermitteln können [11;490]. Weitere lymphangiogen wirksame Wachstumsfaktoren sind dementsprechend VEGF-A, FGF-2, IGF-1 und-2, HGF (hepatocyte growth factor), Angiopoietin-1 und -2 und PDGF-AA, -BB und -CC [11;186;473;490;500]. Auch der ECM wird eine Schlüsselrolle in der Lymphangiogenese zugeschrieben und assoziierte Moleküle, wie Hyaluron, Integrine, IL-7 und MMPs, bereiten die wichtigsten Vorbedingungen für Wachstum, Migration, Röhrenformation und Überleben der LECs [204].

Die Tumorlymphangiogenese ist vermutlich ein frühes Ereignis in der Karzinogenese [473]. Allerdings ist der Einfluss tumorassoziierter Lymphgefäße auf die Aggressivität von Tumoren nicht eindeutig, da Studien häufig zu widersprüchlichen Ergebnissen auch innerhalb einzelner Tumorentitäten geführt haben [473]. Dies könnte ein Problem der Methodik sein, möglicherweise ist die Lymphangiogenese aber auch in verschiedenen Karzinomen unterschiedlich relevant [473]. Grundsätzlich bieten Lymphgefäße durch ihre Durchlässigkeit und ihre langsam fließende, überlebensfreundlichere Lymphe metastatisch kompetenten Tumorzellen eine gute Möglichkeit, den Primar zu verlassen und Metastasen in Lymphknoten und nachfolgend auch in entfernten Organen zu etablieren [8]. Lymphangiogenese ist in einigen Tumorentitäten auch mit einer gesteigerten allgemeinen Tumoraggressivität verbunden [205]. Möglicherweise sind die LECs durch Sekretion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen sogar in der Lage selbst Metastasierung, Tumorwachstum und Invasivität zu induzieren [383;500]. Bei Untersuchungen zur Lymphgefäßdichte (LVD, lymphatisch vaskuläre Dichte) werden zumeist intratumorale und peritumorale Lymphgefäße von einander unterschieden (ITL, intratumorale Lymphgefäßdichte; PTL, peritumorale Lymphgefäßdichte). Wobei peritumorale Lymphgefäße teilweise als wichtiger für eine lymphatische Metastasierung erachtet werden [205], da intratumorale Gefäße selten funktional sind [11;58;370;473]. Dennoch sind auch letztere in diversen Tumorentitäten prognostisch [205].

Vorarbeiten zur Rolle der Lymphangiogenese in endokrinen Tumoren sind rar, allerdings konnten zwei Studien zu endokrinen Pankreaskarzinomen eine größere intratumorale Lymphgefäßdichte mit einer schlechten Prognose assoziieren [420;447].

1.3. Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem möglichen Einfluss ausgewählter MMPs, TIMPs, VEGFs und VEGFRs, sowie der Angiogenese und Lymphangiogenese auf das Wachstum, die Metastasierung und die Überlebenszeit im neuroendokrinen Tumor, fokussiert auf das Ileumkarzinoid mit EC-Zellursprung, mit dem Ziel Erkenntnisse über die Tumorbiologie zu gewinnen, sowie potentielle therapeutische Ansatzpunkte und mögliche prognostische Faktoren zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1. Übersicht

Um Aussagen über etwaige therapeutische Ansätze oder prognostische Aussagen der beschriebenen Marker treffen zu können, wurden für diese Arbeit sowohl klinische Daten gesammelt, als auch verschiedene laborchemische Methoden eingesetzt. Zur Evaluation der Karzinoide, ihrer lymphatischen und hepatischen Metastasen und des Normalgewebes wurde sowohl auf die histopathologische Beurteilung von HE gefärbten Präparaten durch einen Pathologen, als auch auf die mRNA-Expression und immunhistochemische Anfärbbarkeit des EC-Zell-Markers VMAT-1 zurückgegriffen. Die Stadieneinteilung wurde nach aktuellen Standards, wie auch der Bestimmung des KI-67-Index, reevaluiert. Zur Untersuchung der Expressionsprofile der Marker wurde RNA aus Paraffinpräparaten extrahiert, cDNA mittels reverser Transkription synthetisiert und mit Hilfe hochspezifischer Primer/Probe-Sets die Expressionsrate durch real-time quantitative TAQMAN® RT-PCR (qRT-PCR) bestimmt. Die Expressionsprofile wurden mittels des Housekeeping-Gens GAPDH normalisiert, statistisch ausgewertet und mit klinischen Daten korreliert. Die mikrovaskuläre Gefäßdichte der Tumoren wurde für CD-31 positive Gefäße, sowie für LYVE-1 positive Lymphgefäße bestimmt. Um die Ergebnisse auf ein *in vivo* Modell übertragen zu können, wurde ebenfalls mit einer neuroendokrinen Zelllinie BON6 gearbeitet, deren Expressionsmuster mit anderen Zelllinien verglichen wurde.

2.2. Häufig verwendetes Material

Angaben über in dieser Arbeit genutzte Geräte finden sich, ebenso wie die Standorte der Herstellerfirmen, unter dem Unterpunkt „Geräte, Verbrauchsmaterialien und Herstellerfirmen“ (Seite 173).

2.2.1. Puffer

Sämtliche Puffer wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und bei Bedarf nochmals im Autoklav sterilisiert.

Phosphate-Buffered-Saline (PBS)

- NaCl 137mM (Merck)
- KH_2PO_4 1,5mM (Merck)
- $Na_2HPO_4x2H_2O$ 4,3mM (Merck)
- KCl 2,6mM (Merck)
- pH 7,4

TRIS-Puffer

- Trizma Base 20mM (Fluka)
- NaCl 150mM (Merck)
- pH 7,6 mit HCl eingestellt

Citratpuffer

- Citratsäure 10mM (Merck)
- pH 6,0 mit NaOH eingestellt

Phosphatpuffer

- $NaH_2PO_4xH_2O$ 1,2mM (Fluka)
- $Na_2HPO_4x7H_2O$ 16,9mM (Sigma)
- NaCl 0,15 M (Merck)
- pH 7,8, 10 mM

2.2.2. Chemikalien

Die meisten Chemikalien und ihre Herstellerfirmen werden jeweils direkt im Zusammenhang mit ihrer Verwendung erwähnt. Bei hohen Anforderungen an den Reinheitsgrad wurde Aqua ad injectabila (Fresenius) eingesetzt, sonst bidestiliertes Wasser (10l, AppliChem). Häufiger genutzte Reagenzien zur Entparaffinierung werden im Anschluss in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Xylol	Isomerengemisch für die Histologie	(AppliChem)
Isopropanol	Ph.Eur.	(Apotheke)
Ethanol	absolut 99,8%	(Apotheke)

Tabelle 2.1: Reagenzien zur Entparaffinierung

2.3. Zellkultur

2.3.1. Zelllinien

Im Anschluss werden die verwendeten Zelllinien, ihre Herkunft und ihre Kulturbedingungen beschrieben.

- AGS

Ursprung: Adenokarzinom des Magens
Spezies: human
Herkunft: CRL-1739, ATCC cultures
Nährmedium: DMEM-F12 + 10% FBS
Inkubation: 37℃, 5% CO_2

- Bon-6

Ursprung: Metastase eines Karzinoids des Pankreas mit EC-Zellursprung
Spezies: human
Herkunft: Th. Seufferlein, Universität Ulm
Nährmedium: DMEM-F12 + 10% FBS
Inkubation: 37℃, 5% CO_2

- Caco-2

Ursprung: kolorektales Adenokarzinom
Spezies: human
Herkunft: HTB-37, ATCC cultures
Nährmedium: DMEM + 20% FBS + 1% AS
Inkubation: 37℃, 5% CO_2

- HUVEC-CS

Ursprung: normale Gefäßendothelzelle der umbilikalen Vene
Spezies: human
Herkunft: CRL-2873, ATCC cultures
Nährmedium: DMEM + 4,5 g/L Glucose + 20% FBS
Inkubation: 37℃

- KATO III

Ursprung: Pleuracarcinose eines Magenkarzinoms
Spezies: human
Herkunft: HTB-103, ATCC cultures
Nährmedium: RPMI + 20% FBS
Inkubation: 37℃, 5% CO_2

- MIA PaCa-2

Ursprung: Pankreaskarzinom
Spezies: human
Herkunft: CRL-1420, ATCC cultures
Nährmedium: DMEM + 10% FBS +2,5% Pferdeserum
Inkubation: 37℃, 5% CO_2

- PC-3

Ursprung: Knochenmetastase eines Adenokarzinoms der Prostata
Spezies: human
Herkunft: CRL-1435, ATCC cultures
Nährmedium: DMEM-F12 + 10% FBS
Inkubation: 37℃, 5% CO_2

2.3.2. Praktische Durchführung

Bei der Kultivierung der Zellen wurden ausschließlich sterile Materialien und zuvor autoklavierte Puffer und Lösungen verwendet. Zudem wurde stets an einer für Zellkultur vorbehaltenen Sterilbank (BDK) gearbeitet. Das fötale Kälberserum (Fetal Bovine Serum, FBS) und das Pferdeserum (Horse Serum) wurden in einem Wasserbad bei 56℃ für 30 Min. hitzeinaktiviert und, ebenso wie die Aminosäuremischung (AS) und die Antibiotikamischung aus Penizillin und Streptomycin, aliquotiert bei –20℃ gelagert. Die Zellkulturen wurden vor jedem Mediumswechsel und jeder Passage mikroskopisch auf Zelldichte, Kontamination und Vitalität untersucht. Die Frequenz des Passagierens erfolgte entsprechend des Wachstums und der Dichte der Zellen. Die verwendeten Zelllinien wurden in den unter 2.3.1 angegebenen Kulturmedien kultiviert. Zur Verhinderung einer bakteriellen Besiedelung wurde jeweils 1% einer Antibiotikamischung (Pen/Strep) zugegeben. Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 2.2 (Seite 29) aufgeführt.

Basismedien:	DMEM		(Gibco)
	DMEM-F12		(Cambrex)
	RPMI		(Invitrogen)
Seren:	Fetal Bovine Serum	steril filtr.	(Sigma)
	Horse Serum		(Sigma)
Aminosäuren (AS)	Amino Acids Solution	50x	(Sigma)
Antibiotika:	Penicillin Streptomycin	100x flüssig	(Gibco)
Glucose:	D-(+)-Glucose		(Fluka)
DMSO:	Dimethylsulfoxid		(AppliChem)
Trypsinierungsmedium:	Trypsin EDTA	10x	(Invitrogen)
	HBSS		(Gibco)

Tabelle 2.2: Reagenzien für die Zellkultur

Passagieren der Zellen

Beim Passagieren der Zellkulturen, die alle adhärent waren, wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

- Absaugen des verbrauchten Mediums mit einer sterilen Pasteurpipette
- Zugabe von 1x Trypsin/EDTA in HBSS und Inkubation für circa 5 Min. im Brutschrank bei 37℃
- Vorsichtiges Abklopfen der Flasche
- Mikroskopische Kontrolle der vollständigen Ablösung der Zellen
- Überführung der Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen
- Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe des gleichen Volumens Kulturmedium mit Trypsininhibitor enthaltendem FBS (10%)
- Zentrifugation bei 300xg und RT für 10 Min., Abnahme des Überstandes unter Schonung des Zellpellets und Resuspension mit 1ml PBS
- Zellzahlbestimmung in Neubauer-Zählkammer
- Auffüllen der Suspension mit PBS, Zentrifugation bei 300xg und RT für 10 Min., Abnahme des Überstandes unter Schonung des Zellpellets und Resuspension des Pellets im entsprechenden Kulturmedium
- Überführung der Suspension in eine Zellkulturflasche mit Membranverschluss und der Zelllinie entsprechendem frischen Medium inklusive
- Inkubation der Zellen im Brutkasten bei 37℃ und 5 % CO_2 in wasserdampfgesättigter Atmosphäre

Zur Gewinnung von Zellmaterial wurde die PBS-Zell-Suspension in 1ml Röhrchen auf circa 5x106 Zellen aliquotiert, zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das resultierende Pellet entweder direkt weiterverarbeitet oder bei –80℃ konserviert.

Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10µl der 1ml PBS-Zellsuspension zu 990µl PBS zugegeben (Verdünnungsfaktor = 100) und nach sorgfältigem Durchmischen wiederum 10µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Es wurden jeweils vier 0,1 µl fassende Einheiten, bestehend aus 16 Quadraten, ausgezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

Zellzahl/ml= (Zellzahl in 4 Einheiten/ 4) x 10.000 x Verdünnungsfaktor

Kryokonservierung

Um Zellen nach einiger Zeit der Kältekonservierung wieder nativ in Kultur nehmen zu können, ist die Herstellung von Kryostocks unter der Verwendung von Dimethylsulfoxid (DMSO) erforderlich. DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen und das Zerplatzen der Zellmembran beim Einfrieren, ist allerdings bei Raumtemperatur zytotoxisch. Deswegen werden die einzelnen Arbeitsschritte mit dieser Substanz auf Eis durchgeführt. Im Einzelnen wurde mit der jeweiligen Zellkultur auf folgende Weise verfahren:

- Kontrolle der Zellqualität, Trypsinierung der Zellen und Inaktivierung des Trypsins mit einem Volumenäquivalent Medium
- Zentrifugation (300xg, 10 Min.), Abnahme des Überstandes und Aufnahme des Pellets in 1 ml des entsprechenden Mediums
- Zellzahlbestimmung und Zugabe der Zellen zu dem vorgekühlten Einfriermedium, bestehend aus 80% der Zelllinie entsprechendem Medium, 10% FBS und 10% DMSO

- Aliquotierung der Zellsuspension zu circa $5x10^6$ Zellen in vorgekühlte, beschriftete Kryoröhrchen
- Schonende Abkühlung bei –80℃ für 48h in einem Sty roporbehälter
- Langfristige Lagerung der Kryoröhrchen in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff

Die Zelllinien wurden bei Bedarf auf folgende Weise rekultiviert:

- Entnahme der Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank, Auftauen der Zellsuspension bei 37℃ im Wasserbad
- Überführung der Suspension in 50ml pures Medium zur Verdünnung des DMSO
- Zentrifugation (300g, 10 Min.), Verwerfen des Überstandes, Resuspension des Pellets im entsprechenden vollständigen Medium, Überführung in eine Zellkulturflasche und Inkubation im Brutschrank

2.4. Ileales Karzinoid

2.4.1. Patientenpopulation

Die Patientenpopulation bestand zunächst aus 213 Patienten, die sich wegen einer neoplastischen, neuroendokrinen Erkrankung in diagnostischer und/ oder therapeutischer Behandlung durch die 2. Medizinische Klinik, die Chirurgische Klinik bzw. das pathologische Institut des Klinikums rechts der Isar befanden.
Nach Fokussierung der Arbeit auf EC-Zellkarzinoide des Ileums, Beschränkung auf Patienten mit Zustand nach einer chirurgischen Entfernung des Tumors, Verfügbarkeit des formalinfixierten in Paraffin eingebetteten Materials und nochmaliger mikroskopischer Kontrolle durch einen Pathologen (Dr. Ruppert Langer, pathologisches Institut des Klinikums Rechts der Isar) wurde das Gewebe von zunächst 28 Patienten, sowie von zwei Karzinoiden des Duodenums zur Kontrolle verwendet. Alle Patienten wurden vor der Gewebeentnahme über die mögliche Verwendung des Gewebes zu Forschungszwecken aufgeklärt und stimmten dem zu.
Zur Homogenisierung und somit Verbesserung der Vergleichbarkeit der Daten wurde die Studiengruppe auf gut differenzierte Tumore begrenzt. Somit mussten zwei Patienten aufgrund mangelnder Expression des Markerproteins für EC-Zellen, VMAT-1 (vesikulärer Monoamintransporter-1), im Primärtumor, sowie fraglicher oder fehlender Anfärbbarkeit etablierter Marker, wie Serotonin oder Chromogranin A, von der Studie wegen fraglichen Zellursprungs bzw. mangelnder Differenzierung ausgeschlossen werden. Ein weiteres Präparat stellte sich im Laufe der laborchemischen Arbeit als qualitativ minderwertig heraus. Schließlich beschränkte die Studie sich auf 25 Patienten mit gut differenzierten Karzinoiden des terminalen Ileums.

2.4.2. Klinische Daten

2.4.2.1. Studiendesign

Es handelt sich hier um eine retrospektive Studie, die 25 Patienten mit gut differenzierten Karzinoiden des Ileums betrachtete, die im Zeitraum zwischen 1992 und 2004 im Klinikum Rechts der Isar, München, behandelt wurden. Das Tumorgewebe zweier duodenaler Karzinoide diente als Negativ-Kontrolle.
Bei allen Patienten entsprach das Datum der operativen Primarentfernung annähernd dem Erstdiagnosedatum (maximal + 2 Monate), außer bei einem Patienten, dessen Erstdiagnose bereits drei Jahre zuvor erfolgte. Soweit möglich wurde ein Follow up ab dem Datum der Operation bis zum Stichtag am 01.04.2007 durchgeführt. Die resultierenden Daten wurden zur Erstellung von Kaplan-Meier Überlebensanalysen verwendet. Dabei wurden Todesfälle unabhängig von der Karzinoiderkrankung (1

Patient), das Überleben des Stichtags (11 Patienten) und ein letzter sicherer Lebensbeweis vor dem Stichtag (5 Patienten) gemäß statistischer Richtlinien als „drop out's" (Abbrüche) definiert. In Abbildung 2.1 werden die Beobachtungszeiträume und jeweiligen Endpunkte jedes Patienten detailliert aufgeführt.

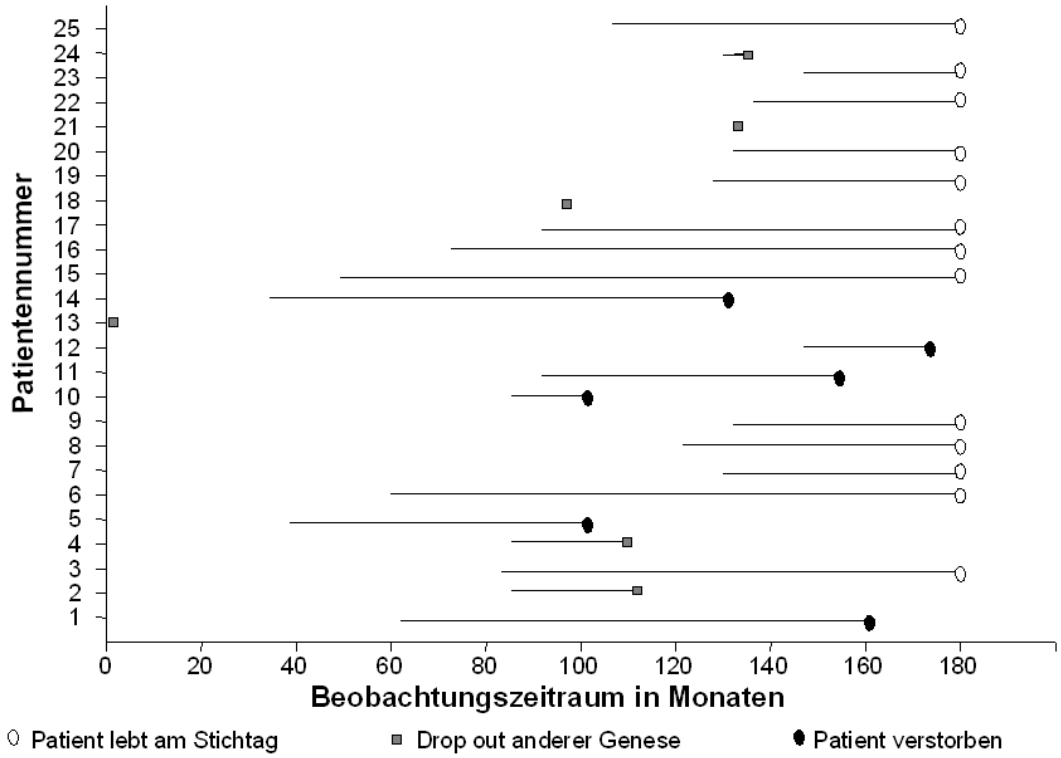


Abbildung 2.1: Beobachtungszeitraum der Studie. Die Darstellung gibt für jeden Patienten detailliert Auskunft über den Beobachtungszeitraum (in Monaten), den Zeitpunkt des Beobachtungsendpunkts und dessen Ursache. Ausgefüllte Ellipsen markieren ein Karzinoid bedingtes Versterben, leere Ellipsen das Überleben des Stichtags und graue Quadrate „Drop outs" anderer Genese.

2.4.2.2. Patientencharakterisierung

Das Alter der Patienten der Studie lag zum Zeitpunkt der Operation bei einem Durchschnitt von 59 Jahren mit einer Standardabweichung von ±14 Jahren in einem Bereich zwischen 35 und 87 Jahren. Es gab 15 weibliche und 10 männliche Patienten. Tabelle 2.3 fasst die laut Aktenlage postoperativ durchgeführten adjuvanten Therapien zusammen. Dies betraf insgesamt sieben Patienten, bei sechs bestanden Fernmetastasen. Soweit bekannt, unterzog sich keiner der Patienten einer neoadjuvanten, also präoperativen Therapie.

Pat #	**n=25**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**
Ctx	**3**					**X**							**X**													**X**
Rtx	**0**																									
SSA	**7**		**X**	**X**		**X**			**X**			**X**	**X**													**X**
Int	**3**		**X**			**X**																				**X**
DOT	**2**											**X**	**X**													

Tabelle 2.3: Postoperative adjuvante Therapien. Darstellung der bekannten adjuvanten Therapiemaßnamen jedes Patienten. Ctx: Chemotherapie, Rtx: Radiotherapie, SSA: Somatostatinanaloga, Int: Interferon, DOT: DOTATOC-Radionuklidtherapie.

2.4.2.3. Klinik

Im Rahmen des Aktenstudiums wurden auch klinische Daten betreffend der Symptomatik erhoben. Tabelle 2.4 gibt einen Überblick über die klinischen Symptome. Sie beziehen sich vor allem auf Befunde zum Zeitpunkt der operativen Primarentfernung. Die Daten über eine kardialer Symptomatik (Hedinger-Syndrom) wurden allerdings auch im Verlauf der Erkrankung gesammelt. Postoperativ verbesserte sich die Symptomatik bei einem Teil der Patienten. Im Zuge des Krankheitsprogresses traten allerdings auch vermehrt subileale Zustände und Diarrhöen auf.
Sekundärkarzinome fanden sich bei 5 Patienten. Es handelte sich dabei um ein Adenokarzinom mit möglichem Ursprung im Ovar, ein Nierenzellkarzinom, ein Karzinom des Uterus, ein AEG III des Magens, und einen Patienten mit jeweils einem Karzinom des Kolons und der Mamma. Bei der Diagnostik des HIES-Spiegels im 24h-Urin zeigten sich bei 8 von insgesamt 13 Untersuchungen pathologisch erhöhte Werte.

	path. Befund	***Normalbefund***	keine Angabe
Diarrhoe	11	6	8
Flush	6 (+3)	9	7
Hedinger-Syn.*	1	6	18
Schmerz	11	6	8
Gewichtsverlust	7	1	17
Leistungsabfall	2	1	22
Nachtschweiß	1	0	24
ETOH-Unvertr.	2	0	23
Obstipation	3	1	21
Subileus	1	0	24
Erbrechen	2	1	22
Übelkeit	1	0	24
Meteorismus	3	0	22

Tabelle 2.4: Klinik. Die Aufstellung fasst pathologische und normale perioperative klinische Befunde zusammen. Die in Klammer angegebene Zahl entspricht den fraglichen Flush-Diagnosen. * weist auf Daten hin, bei denen auch erst im Krankheitsverlauf aufgetretene Symptome einbezogen wurden. (ETOH = Ethanol, Alkohol)

2.4.2.4. Staging

Das Staging zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs wurde unter Zuhilfenahme der Krankenakten und der histologischen Präparate für jeden Patienten nach aktuellen Vorgaben [411] vorgenommen und ist detailliert in Tabelle 2.7 (Seite 36) angegeben. Entsprechend der aktuellen Empfehlung der European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) (November 2006) für Karzinoide des unteren Jejunums und Ileums (siehe Tabelle 2.5 und Tabelle 2.6, S.35) wurde der TNM-Status und die Einteilung des Stadiums bestimmt.
Ebenso richtete sich das Grading nach ENETS-Vorgaben. Die Gradeinteilung bei den NET des Mittel- und Hinterdarmes orientiert sich an der proliferativen Aktivität des Tumors, die mittels des KI-67-Indexes oder Zählung der Mitosen bestimmt wird [411]. Da in dieser Arbeit der KI-67-Index benutzt wurde, wird im Folgenden nur auf diesen eingegangen. Die Bestimmung des KI-67-Index und der dazu notwendigen immunhistochemischen Färbung wird detailliert in den Abschnitten 2.8.4 (Seite 51) und 2.8.5 (Seite 52) beschrieben.

Die Gradeinteilung ist wie folgt definiert:
G1 KI-67-Index < 2%
G2 KI-67-Index 2-20%
G3 KI-67-Index > 20%
G1 und G2 graduierte neuroendokrine Tumore gelten als gut differenziert und zeigen üblicherweise eine diffuse und intensive Expression der zwei allgemeinen immunhistochemischen Marker Chromogranin A und Synaptophysin. Wohingegen G3 Tumoren als schlecht differenziert gelten, eine signifikant reduzierte Chromogranin A Expression und eine intensive Anfärbbarkeit für Synaptophysin zeigen [411].

T- Ausdehnung des Primärtumors	
TX	Primärtumor nicht beurteilbar
T0	Kein Nachweis eines Primärtumors
T1	Tumorinvasion in Mukosa oder Submukosa und Tumordiameter ≤ 1cm
T2	Tumorinvasion in Muscularis propria oder Tumordiameter > 1cm
T3	Tumorinvasion der Subserosa
T4	Tumorinvasion in Peritoneum/anderer Organe
Zusatz (m) für multiple Tumoren	bei jedem T
N- Status regionaler Lymphknoten	
NX	regionale Lymphknoten nicht beurteilbar
N0	keine regionalen Lymphknotenmetastasen
N1	regionale Lymphknotenmetastasen
M- Fernmetastasierung	
MX	Fernmetastasierung nicht beurteilbar
M0	keine Fernmetastasierung
M1	Fernmetastasierung (Spezifizierung der Lokalisation empfohlen)

Tabelle 2.5: TNM-Klassifikation für neuroendokrine Tumoren des tiefen Jejunums und Ileums (ENETS 2006)

Stadien	T-Primärtumor	N-regionale Lymphknoten	M- Fern-metastasen
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium II A	T2	N0	M0
Stadium II B	T3	N0	M0
Stadium III A	T4	N0	M0
Stadium III B	jedes T	N1	M0
Stadium IV	jedes T	jedes N	M1

Tabelle 2.6: Stadieneinteilung endokriner Tumoren des unteren Jejunums und Ileums (ENETS 2006)

Die Evaluation des R-Status orientierte sich nach allgemein gültigen Richtlinien. R0 steht hierbei für eine vollständige Resektion des Tumors, R1 für mikroskopisch sichtbare Residuen, R2 für makroskopisch offensichtliche Residuen und RX für einen unbekannten Status.
Tabelle 2.7 (Seite 36) zeigt eine Zusammenfassung der histopathologischen Daten. Alle 25 Patienten zeigten zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs bereits lokale Lymphknotenmetastasen (N1). Histologische Präparate standen dabei von 24 zur Verfügung. Eine Fernmetastasierung (M1) bestand bei 10 Patienten, die alle hepatische

Filiae präsentierten. 8 Präparate der Lebermetastasen waren verfügbar. Zusätzlich wurden bei einigen Patienten der M1-Gruppe Fernmetastasen anderer Lokationen nachgewiesen. Es fanden sich peritoneale Metastasen (n=3), Fettgewebsmetastasen (n=1) und eine Filia im Appendix. Eine multiple Tumorverteilung im Ileum fand sich bei 28% der Patienten.

Pat #	pT1	pT2	pT3	pT4	mult	N1	M0	M1	Stadium	Residuum	KI-67	G1	G2	Tu Ø mm
n = 25	3	10	6	6	7	25	15	10			%	19	6	MW 19 ± 11
1				X		X		X	IV	R1	1,1	X		30
2		X				X		X	IV	R1	2,7		X	30
3		X				X	X		IIIB	R0	0,7	X		30
4				X		X		X	IV	R0	0,9	X		25
5				X		X		X	IV	R0	2,6		X	50
6	X					X	X		IIIB	R1	2,0	X		4
7			X		X	X	X		IIIB	R0	0,4	X		10
8			X			X		X	IV	R0	2,9		X	15
9		X			X	X	X		IIIB	R0	1,4	X		15
10		X				X		X	IV	R0	1,6	X		22
11				X	X	X		X	IV	R2	1,7	X		30
12		X			X	X		X	IV	R2	0,4	X		15
13			X		X	X	X		IIIB	RX	1,9	X		12
14				X	X	X	X		IIIB	RX	1,1	X		12
15		X				X	X		IIIB	R0	2,4		X	15
16	X					X	X		IIIB	R0	1,1	X		8
17		X				X		X	IV	R1	0,8	X		15
18		X			X	X	X		IIIB	R0	2,3		X	15
19		X				X	X		IIIB	R0	1,7	X		10
20			X			X	X		IIIB	R0	2,0	X		13
21		X				X	X		IIIB	R0	2,0	X		25
22			X			X	X		IIIB	R0	1,3	X		20
23	X					X	X		IIIB	R0	2,1		X	3
24			X			X	X		IIIB	R0	1,0	X		15
25				X		X		X	IV	R1	1,6	X		30

Tabelle 2.7: Tumordaten. Die Angaben betreffen die Tumorstadien der einzelnen Patienten hinsichtlich T-Status, Lymphknotenmetastasierung (LN), Fernmetastasierung (M), multipler Tumorverteilung (mult), Krankheitsstadium, Tumorresiduen (R), Grading (G) und Tumordurchmesser (Tu ∅).

2.4.2.5. Diagnostische Immunhistochemie

Eine aktuelle ENETS-Leitlinie empfiehlt zur histopathologischen Diagnostik eines jejuno-ilealen neuroendokrinen Tumors einen immunhistochemischen Nachweis der allgemeinen neuroendokrinen Marker Chromogranin A und Synaptophysin, sowie optional des EC-Zell-spezifischen Serotonins [112]. In neuroendokrinen Tumoren sind allgemein Chromogranin A, neuronenspezifische Enolase (NSE) und Synaptophysin stark exprimiert [57]. Zur Spezifizierung eines EC-Zell-Ursprungs können abgesehen von Serotonin, auch noch weitere Sekretionsprodukte, wie das Tachykinin Substanz P angefärbt werden [274]. Seltener nachzuweisen sind allerdings andere Peptidhormone, wie Gastrin, Somatostatin, Bombesin, pankreatisches Polypeptid (PP), Calcitonin, Cholecystokinin, adrenocorticotrophisches Hormon (ACTH), Enteroglucagon, Glucagon, Motilin und Neurotensin [274]. Teilweise gilt die Identifizierung als EC-Zell-Tumor durch eine Serotoninfärbung gesichert [390].

Im Rahmen der Diagnostik wurde durch das pathologische Institut des Klinikums rechts der Isar an den OP-Präparaten eine Vielzahl verschiedener immunhistochemischer Färbungen durchgeführt. Tabelle 2.8 gibt nur den Teil der Färbungen wieder, bei denen mindestens ein positives Ergebnis detektiert wurde. Sporadisch durchgeführte Färbungen gegen Somatostatin, Beta-HCG, Insulin, Glukagon, VIP, Neurotensin, Nfpan, ACTH, AFP, SRIF, Neurofilament und Bombesin waren allesamt negativ. Die für die Karzinoiddiagnostik wichtigen und allgemein anerkannten Markerproteine Serotonin, Chromogranin A und Synaptophysin wurden nur bei 15 bzw. sechs Patienten untersucht. Zur Vollständigkeit wurde dies für den Marker Serotonin bei den restlichen Tumoren nachgeholt (siehe Abbildung 2.2). Bei den Patienten 7, 9, 17, 20, 21, 22, 24 und 25 wurde zuvor gar keine immunhistochemische Diagnostik durchgeführt. Die Diagnose wurde hier primär allein aufgrund der karzinoidtypischen mikroskopischen Präsentation der Tumore (Abbildung 2.3) und der entsprechenden Klinik gestellt.

Pat # (n=25)	P/G	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	X
Chromogranin	15/15	P	P	P	P	P			P		P	P	P	P	P		P		P	P				P			P
NSE	11/12		P	P	P	N			P		P	P		P			P			P				P			P
Synaptophysin	6/6	P			P				P			P	P							P							
Serotonin	23/25	P	P	P	P	N	P*	P*	P*	P*	P	P	P*	P	P	N	P	P*	P	P	P*	P*	P	P	P*	P*	N
Substanz P	8/11	P	P	P			P				P	N	P	P	N	TP	P							N			
Phe 5	7/11	P		P	N	N					P	P		P	P		P			N				N			N
Gastrin	1/10	N	N	N	N	N					TP	P		N			N			N				N			N
PP	1/12	N	N	P	N	N					N	N		N	N		N			N				N			N
S-100-Protein	1/7	N	N	N	N						N			P			N										N
ZytokeratinLU5	1/1				P																						
Alpha-HCG	1/12	N	N	N	N	N	N				N			N	N	P	N							N			N

Tabelle 2.8: Diagnostische Immunhistochemie. Die Auflistung zeigt eine Auswahl der zur ursprünglichen Diagnostik durchgeführten, immunhistochemischen Färbungen. P bezeichnet eine positive Anfärbung, N eine negative. Mit einem * sind im Rahmen dieser Arbeit nachgeholte Serotoninfärbungen markiert. Die Spalte P/G gibt den Anteil positiver Färbungen zur jeweiligen Gesamtanzahl ohne Berücksichtigung der Spalte X an. Die grau gehaltene Spalte X zeigt die Daten eines duodenalen Karzinoids. Mit TP sind uneindeutige Ergebnisse verzeichnet.

Im Falle einer Färbung waren die Tumore für die allgemeinen endokrinen Marker beinahe durchgängig positiv. Wohingegen die EC-Zell spezifischen Marker Serotonin (5-HT = Hydroxytryptamin) und Substanz P ein etwas weniger eindeutiges Ergebnis zeigten. Die Vielzahl weiterer Marker zeigte das zu erwartende uneinheitliche Bild.

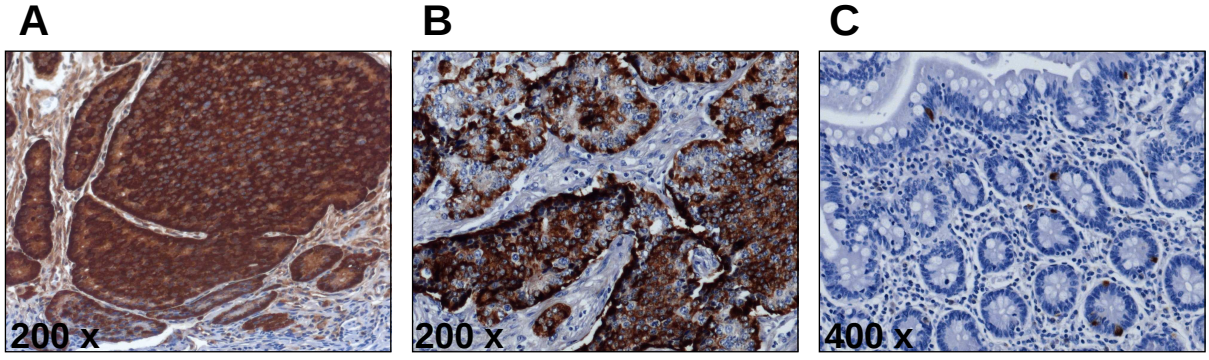


Abbildung 2.2: Immunhistochemische Serotoninfärbung. Gezeigt sind zwei primäre Ileumkarzinoide mit unterschiedlich intensiver immunohistochemischer Anfärbbarkeit für Serotonin (Bild **A** und **B**), sowie normale Ileumschleimhaut mit singulären Serotonin positiven Zellen (Bild **C**). Der verwendete Vergrößerungsfaktor ist jeweils indiziert.

2.4.3. Probengewinnung

In dieser Arbeit sollten die Gewebeproben von Primärtumoren, Lymphknotenfiliae, entsprechender („gematchter“) normaler Mukosa des Ileums und wenn vorhanden Fernmetastasen der Leber sowohl immunhistologisch, als auch mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht werden.
Deswegen sollte die histologische Struktur erhalten und eine Autolyse, die zu einer Degradation der Nukleinsäuren führt, verhindert werden. Zudem sollte eine chemische Modifikation der Nukleinsäuren durch den Konservierungsprozess möglichst vermieden werden, da es sonst zu einer Beeinträchtigung der nachfolgenden PCR kommen kann. Diesen Punkten wird die verwendete Fixierungs- und Einbettungsmethode weitgehend gerecht, wenn auch chemische Modifikationen und konsekutive Strangbrüche unvermeidlich sind. Durch geeignete Nukleinsäure-Extraktions-Methoden und Anpassung der PCR kann daraus resultierenden Ergebnisverfälschungen entgegengewirkt werden.

Materialeinbettung

Zur Erhaltung der Feingewebsstruktur und Verhinderung von Autolyse wurde das chirurgisch gewonnene Material sofort formalinfixiert, dann dem Gewebe mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe Wasser entzogen und über das Zwischenmedium Xylol in Paraffin eingebettet.
Hierfür führte ein Fixierungsautomat (Pathcentre, Shandon) über Nacht folgende Arbeitsschritte aus:

- Ethanol 70% (40℃)
- Ethanol 96% (40℃)
- Isopropanol (40℃)
- Xylol (40℃)
- Paraffin (60℃)

Anschließend wurden die Gewebeproben auf Kunststoffträgern in einen Paraffinblock eingegossen.

Anfertigung histologischer Schnittpräparate

Die Paraffinblöcke wurden freundlicherweise von befähigten Personen mittels eines Rotationsmikrotoms (HM 355 S, Microm) geschnitten. Schnittpräparate zur histologischen Aufarbeitung wurden in 2 bzw. 4 µm Stärke hergestellt, diejenigen zur RNA-Extraktion in 10 µm Stärke und auf Objektträger (Superfrost, Menzel-Gläser) aufgebracht.

2.4.4. Histopathologische Evaluation

Zur histopathologischen Evaluation der durch das pathologische Institut bereits diagnostizierten Karzinoide des terminalen Ileums wurde je ein Schnitt pro Präparat mit HE (Hämatoxylin-Eosin) gefärbt (Abbildung 2.3). Diese Färbung war aufgrund der klassischen Morphologie des EC-Zellkarzinoids zunächst ausreichend. Ein Pathologe bestätigte jeweils die korrekte Klassifizierung des Präparats als primärer Karzinoidtumor des terminalen Ileums, als normale Mukosa des Ileums, als lymphatische oder als hepatische Metastase, sowie deren Ausdehnung.

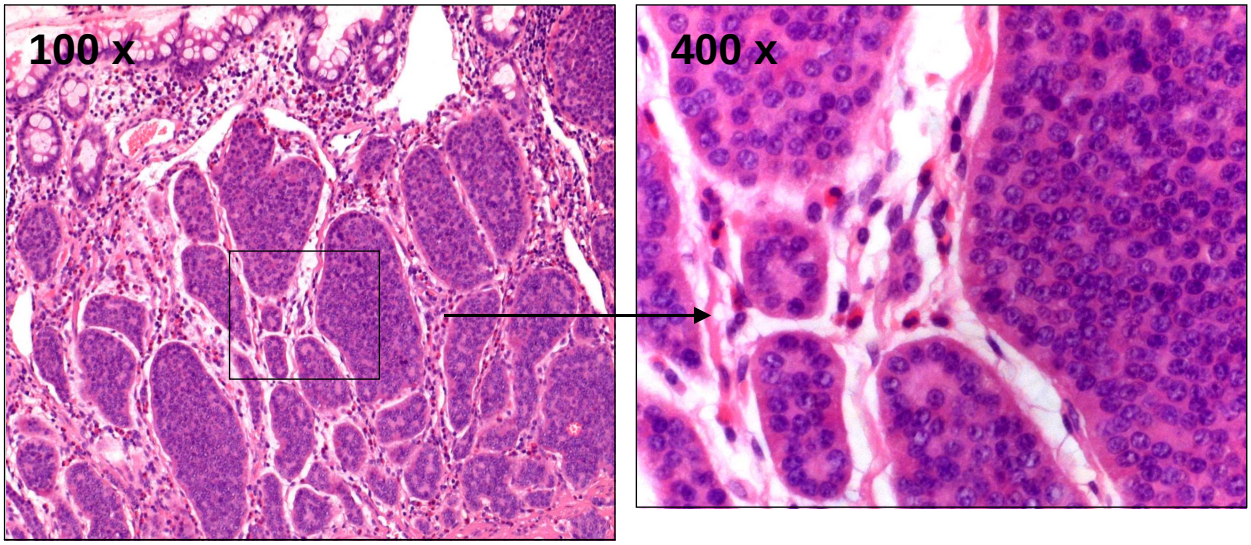


Abbildung 2.3: HE-Färbung eines primären Ileumkarzinoids. Zu sehen ist ein routinemäßig mit Hämatoxylin-Eosin gefärbter Primärtumor mit typischer Morphologie. Die mikroskopischen Vergrößerungsfaktoren sind indiziert.

2.5. RNA-Extraktion

Das Augenmerk lag auf möglichen Änderungen im Gen-Expressionsprofil der Zellen bei der Entstehung und dem Verlauf der Karzinoiderkrankung. Damit stand die m-RNA Menge der Marker im Mittelpunkt des Interesses und da die anvisierten Marker im Genom allesamt mit nichtkodierenden Intron-Sequenzen versehen sind, beschränkte sich die Nukleinsäureextraktion auf die RNA-Gewinnung.

2.5.1. Isolierung von RNA aus Zellkulturen (RNeasy Mini Kit)

Da die Fragmentierung der Nukleinsäurestränge bei frisch lysiertem Zellmaterial keine große Rolle spielt, konnte bei der RNA-Extraktion aus den oben beschriebenen Zelllinien auf einen zeitsparenden, einfach durchzuführenden kommerziellen Kit zurückgegriffen werden. Diese funktionieren zumeist nach dem Prinzip der Adsorption der Nukleinsäuren an eine Silicamembran in salzhaltigen Puffern. Hierbei werden mittlere bis lange Fragmente aufgereinigt, kurze jedoch nicht an die Matrix gebunden und gehen somit verloren.

Material:

- RNeasy Mini Kit (Qiagen)
- Ethanol absolut zur Analyse (Applichem)
- 2-Merkaptoethanol zur Analyse (Merck)

Praktische Durchführung:

Zur Vermeidung einer Überladung der Silicamembran wurde nur eine Menge von bis zu $1x10^7$ Zellen eingesetzt. Zunächst wurde das Material lysiert und homogenisiert. Nach Protokoll wurde jeweils einem Milliliter des GITC-enthaltenden Puffers RLT 10 µl 2-Merkaptoethanol zugesetzt. Zur Zerstörung der Zellmembran wurde bei einem Pellet geringer als $5x10^6$ Zellen 350 µl und einem größeren Pellet 600 µl des vorgemischten RLT-Puffers hinzugefügt, danach mittels eines Vortex-Schüttlers gemischt und durch starken Sog durch eine Kanüle mit Hilfe einer Spritze die Zellen homogenisiert. Im nächsten Schritt wurde, um die Bindungsbedingungen herzustellen, ein Volumen 70 % Ethanol hinzupipettiert und vermischt. Danach wurde die Probe auf eine im Kit

enthaltene Säule gegeben und durch die anschließende Zentrifugation (8000xg, 15 Sek.) die RNA an die Silica-Membran gebunden, während das restliche Zellmaterial verworfen wurde. In den folgenden Schritten wurden mittels im Kit enthaltener Puffer Kontaminationen durch Zentrifugation herausgewaschen, zunächst mit 700 µl RW1-Puffer (8000xg, 15 Sek.), dann zweimalig mit 500µl RPE-Puffer (8000xg, 15 und 120 Sek.). Abschließend wurde die RNA zweimal mit 50 µl DNAse-freiem Wasser (8000xg, 1 Min.) eluiert.

2.5.2. RNA-Isolierung mittels Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode

Bei dem hier eingesetzten, Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebe besteht, wie bereits oben ausgeführt, im Vergleich zu frisch lysiertem Zellmaterial auf Grund der Einwirkung von Formaldehyd und Hitze die Problematik von Strangbrüchen. Dadurch wird eine Extraktionsmethode notwendig, bei der auch kurze Fragmente aus einer geringen Materialmenge aufgereinigt werden können. Eine Möglichkeit hierzu bietet die klassische Phenol-Chloroform-Extraktion, gefolgt von einer Isopropanol-Fällung

Vorbereitung der Präparate

Zunächst wurden dafür die auf Objektträgern aufgebrachten, 10 µm dicken Schnitte der Präparate entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe ins wässrige Milieu überführt. Die dafür notwendigen Schritte waren im Einzelnen:

- Entparaffinierung im Xylolbad 2 x 20 Min.
- Überführung in wässriges Milieu:
  - Ethanol 100% 10 Min.
  - Ethanol 90% 5 Min.
  - Ethanol 70 % 5 Min.
  - Aqua dest

Selektive Materialgewinnung

Aufgrund der mikroskopisch eindeutigen Morphologie und des sehr geringen Stromaanteils der Karzinoidtumore, sowie der Mukosa konnte bei der selektiven Materialgewinnung auf eine einfache Abkratzmethode zurückgegriffen werden. Dabei wurde das entparaffinierte Gewebe kurzzeitig (etwa 15 Sekunden) mittels einer Pipette mit einer Hämalaun-Lösung bedeckt und mit Aqua dest. gewaschen, dann das gewünschte Material unter mikroskopischer Sicht mit einem Skalpell abgekratzt und in den vorbereiteten Lysepuffer überführt.

Lyse der Dissektate

Zur Lyse wurde das Material in einem Röhrchen mit 200 µl Lysepuffer, dessen Zusammensatzung in Tabelle 2.9 aufgelistet ist, und 10 µl Proteinase K (50 mg/ml, AppliChem) über Nacht in einem Brutschrank bei 60℃ inkubiert. Große Gewebemengen wurden zuvor mittels einer Spritze homogenisiert.

Tris-HCl		10 mmol/l	pH 8,0	(Rockland Im.)
EDTA	(Ethylendiamintetraacetat)	0,1 mmol/l	pH 8,0	(AppliChem)
SDS	(Natriumdodecylsulfat)	2%	pH 7,3	(AppliChem)

Tabelle 2.9: Lysepuffer zur RNA-Extraktion

RNA-Aufreinigung und Isopropanolfällung

Bei der bereits erwähnten Phenol-Chloroform-Extraktion der RNA mit anschließender Isopropanolfällung wurde, um das Pellet trotz der geringen Nukleinsäuremengen gut sichtbar zu machen und Pipettierfehler zu minimieren, Glycogen als Co-Präzipitans verwendet. Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 2.10 (Seite 41) aufgelistet und es wurde nach dem folgenden Protokoll gearbeitet:

- 200 µl Zelllysat, 20µl Natriumacetat, 10 µl Chloroform-Isoamylalkohol und 200 µl Phenol in einem Safe Lock Reaktionsgefäß (Eppendorf) mittels Vortex-Schüttler vermischen
- Zur Phasentrennung, Gemisch für 6 Min. bei höchster Geschwindigkeit zentrifugieren (Tischzentrifuge Spectrafuge 24D, Labnet)
- Wässrigen Überstand ohne Verletzung der Trennschicht in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- Zur Fällung, 2 µl Glycogen und 220 µl Isopropanol hinzugeben und die RNA für mindestens 45 Min. bei –20℃ inkubieren
- Gemisch bei 4℃ für 30 Min. mit höchster Geschwindigkeit zentrifugieren (Kühlzentrifuge, Eppendorf)
- Überstand unter Schonung des Pellets verwerfen
- 300 µl Ethanol 70% hinzugeben und erneut bei 4℃ für 15 Min. mit höchster Geschwindigkeit zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Pellet lufttrocknen
- Pellet in 20 µl RNAse-freiem Wasser resuspendieren
- RNA-Lösung kurzfristig bei –20℃, langfristig bei –80℃ lagern

Fällungssalz	Natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$)	2 mol/l pH 4,5	(Merck)
Phenol	UltraPure		(Gibco)
	Phenol : Wasser	3,75 : 1	
Chloroform	Chloroform : Isoamylalkohol	24 : 1	(Sigma)
Glycogen		20 mg/ml	(Roche)
Isopropanol		reinst	(Roth)
Ethanol		70%	(Roth)
Aqua dest	RNAse frei		

Tabelle 2.10: Reagenzien zur RNA-Extraktion

2.5.3. Vermeidung von RNAse-Kontamination

Bei der Extraktion und weiteren Verarbeitung von RNA ist es wichtig, eine Kontamination mit exogenen RNAsen möglichst zu vermeiden. Deswegen wurden bei allen Arbeitsschritten Einmalhandschuhe getragen und regelmäßig gewechselt. Objektträger und Pipettenspitzen wurden nur aus neuen, zuvor ungeöffneten Packungen entnommen. Schneidemesser und Wasserbad wurden regelmäßig erneuert. Reaktionsgefäße und Lösungen wurden 2 Stunden bei 121℃ und 2 Bar autoklaviert und anschließend 4 Stunden bei 100℃ getrocknet. Alle verwendeten Reagenzien wurden aliquotiert und ausschließlich für diesen Zweck verwendet. Frisch isolierte RNA wurde in RNAse-freiem Wasser aufgenommen und kurzfristig bei –20℃, längerfristig bei –80℃ aufbewahrt. Die Arbeitsschritte der cDNA-Synthese wurden alle auf Eis durchgeführt.

2.6. Reverse Transkription

2.6.1. Methodische Grundlagen

Da im Rahmen einer PCR nur DNA vervielfältigt werden kann, muss die isolierte RNA zunächst transkribiert werden. Dazu wird eine reverse Transkriptase, auch RNA-abhängige DNA-Polymerase genannt, genutzt, die anhand eines RNA-Strangs einen hierzu komplementären DNA-Strang (cDNA, complementary DNA) synthetisieren kann. Dieser Vorgang ermöglicht es RNA-Viren, den biologisch üblicheren Weg von DNA zu RNA umzukehren und sich in den Replikationszyklus der Wirtszellen einzuschleusen. Die hier verwendete SuperScript II Reverse Transkriptase ist eine modifizierte Transkriptase des Moloney-Maus-Leukämievirus (MMLV). Das Enzym benötigt für die DNA-Synthese als Ansatzpunkt Primer, diese können entweder genspezifisch oder unspezifisch sein. Da in diesem Schritt zunächst die gesamte RNA umgeschrieben werden sollte, wurden unspezifische Random Hexamere, dies sind zufällig bindende Oligonukleotide aus sechs Basenpaaren, verwendet.

2.6.2. Praktische Durchführung

Primer	Randomhexamers	100 mg/l	(Qiagen)
Desoxyribonukleotid-Mischung (dNTPmix)			(Invitrogen)
	dATP	10 mM	
	dCTP	10 mM	
	dGTP	10 mM	
	dTTP	10 mM	
5 x First Strand Reaktionspuffer			(Invitrogen)
	Tris-HCL pH 8,3	250 mM	
	KCL	375 mM	
	$MgCl_2$	15 mM	
Dithiothreitol (DTT)		0,1 M	(Invitrogen)
Reverse Transcriptase	SuperScript II	200 U/µl	(Invitrogen)
RNAse Inhibitor	RNAseOUT	40 U/µl	(Invitrogen)

Tabelle 2.11: Reagenzien zur reversen Transkription

Entsprechend der Vorgaben des Herstellers Invitrogen wurde nach folgendem Arbeitsprotokoll mit den in Tabelle 2.11 aufgeführten Reagenzien gearbeitet:

- Inkubation von 10 µl RNA mit 1µl Random Primer und 1 µl dNTP Mix bei 65℃ in einem Heizblock für 5 Min. und nachfolgende Kühlung auf Eis zur Erleichterung der Random Hexamerbindung an die RNA
- Zugabe von 4 µl 5x First Strand Reaktionspuffer, 2µl DTT und 1µl RNAse Inhibitor, mischen des Ansatzes und Inkubation bei 25℃ für 2 Min.
- Hinzufügen von 1µl SuperScript II Reverser Transkriptase und erneutes Mischen
- Inkubation des Ansatzes im Thermocycler (Primus 96plus, Biometra) bei
    - 25℃ für 10 Min.,
    - 42℃ für 50 Min.,
    - Inaktivierung der Reaktion bei 70℃ für 15 Min.
- Verdünnung der 20 µl cDNA-Lösung auf 100 µl mit Aqua dest. und Lagerung bei -20℃

2.7. Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

2.7.1. Methodische Grundlagen

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) erlaubt es in vitro gezielt auch minimale Mengen spezifischer DNA-Abschnitte zu vervielfältigen. Bei dieser Methode macht man sich die DNA-abhängige DNA-Polymerase zu nutze, die zu einer Matrize, also einem vorgegebenen DNA-Strang, einen Komplementärstrang amplifizieren kann. Das Enzym benötigt zur Starthilfe das 3'-OH-Ende eines bestehenden DNA-Stranges. Dieser Umstand erlaubt es, durch den Einsatz sequenzspezifischer, einsträngiger DNA-Oligonucleotide, so genannter Primer, den Start- und Endpunkt der Synthese festzulegen und somit spezifische DNA-Sequenzen zu replizieren.
Eine PCR verläuft in Zyklen mit jeweils drei unterschiedlich temperierten Phasen. Da die DNA-Polymerase nur Einzelstränge als Matrize nutzen kann, wird der DNA-Doppelstrang zunächst auf circa 94℃ erhitzt und so mit in zwei Einzelstränge getrennt (Denaturierung). Die anschließende Abkühlung ermöglicht die Bindung der Primer (Annealing) an die jeweilige Komplementärsequenz der DNA. Die optimale Temperatur für diesen Vorgang, auch Schmelztemperatur T_m genannt, ist vor allem von der Länge und der Basenzusammensetzung der Primer abhängig und liegt in der Regel zwischen 37℃ und 70℃. Bei der folgenden Polymerisation des Komplementärstranges (Elongation) bindet die DNA-Polymerase mit Hilfe des Primers an den DNA-Strang. Für die Enzymaktivität ist ebenfalls eine optimale Temperatur notwendig, die abhängig von der Polymerase im Allgemeinen zwischen 68℃ und 72° C liegt.
Der hier genutzte Temperaturbereich würde Proteine normalerweise dauerhaft denaturieren. Erst die Entdeckung thermostabiler DNA-Polymerasen thermophiler Bakterien, deren natürlicher Lebensraum in Tiefseeschloten und Geysiren bei bis zu 110℃ liegt, konnte dieses Problem beheben. Die meist genutzte Variante des Enzyms ist die Taq-Polymerase des Thermus aquaticus. So ist es möglich, den Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation mit Hilfe eines Thermocyclers vollautomatisch, beliebig oft (meist 20 bis 40) zu durchlaufen und auch geringste DNA-Mengen, bzw. selektierte Zielsequenzen exponentiell zu vermehren.
Mittels einer Gelelektrophorese kann anschließend das Amplifikat nachgewiesen werden. Allerdings ist eine Mengenbestimmung auf diesem Weg nur eine grobe Abschätzung, die durch eine densitometrische Messung des Elektrophoresegels präzisiert werden kann. Eine andere Möglichkeit bietet der Northern-Blott, der jedoch eine hohe Materialmenge erfordert. Mittels einer reversen Transkription ist aber auch mit einer herkömmlichen PCR die semiquantitative Bestimmung von mRNA-Mengen möglich.
Ist die Ausgangsmaterialmenge allerdings sehr gering, bietet die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) eine Alternative für eine exakte Genexpressionsmessung. Bei dieser Methode wird der exponentielle Anstieg des Amplifikats registriert und aus den Werten die Ausgangsmenge des Materials extrapoliert. Zur kontinuierlichen Messung der DNA-Vervielfältigung werden meist Fluoreszenzfarbstoffe genutzt. Ihre Intensität wird spectrophotometrisch gemessen und automatisch gespeichert.
In dieser Arbeit kam die TaqMan® PCR zum Einsatz, bei der das Prinzip des Förster/ Fluoreszenz–Resonanz–Energie–Transfers (FRET) genutzt wird. Hierbei handelt es sich um bestimmte Fluorochrom-Paare, auch Donor-Akzeptor-Paare genannt. Nach einer Anregung durch Licht mit entsprechender Wellenlänge gibt der Donor bei unmittelbarer, wenige Nanometer betragender räumlicher Nähe zum Akzeptor-Farbstoff die aufgenommene Energie nicht als Fluoreszenz ab, sondern überträgt sie strahlungsfrei, als Dipol-Dipol-Wechselwirkung, auf den Akzeptor. Erst dieser strahlt die Energie mit

seiner charakteristischen Fluoreszenzwellenlänge aus. Steigt die Entfernung der Farbstoffe zueinander, endet die Energieübertragung und der Donor sendet die Anregungsenergie mit einer Fluoreszenz seiner eigenen charakteristischen Wellenlänge aus. Diese Änderung der Wellenlänge kann detektiert werden.
Bei der TaqMan® PCR wird neben dem üblichen PCR-Primerpaar zusätzlich eine fluorogenes Sonden-Oligonucletid, die sogenannte „Probe“, verwendet, das mit einer für die Zielsequenz spezifischen Nucleotidsequenz zwischen den Primern an den DNA-Strang bindet. Diese Probe ist am 5’-Ende mit einem Donor-Farbstoff, genannt „Reporter“, und am 3’-Ende mit einem Akzeptor-Fabstoff, genannt „Quencher“, versehen. In dieser Arbeit wurde als Reporter-Farbstoff 6-Carbofluorescein (FAM) und als Quencher-Farbstoff 6–Carboxy–Tetramethyl–Rhodamin (TAMRA) eingesetzt. In Lösung strahlt die Sonde aufgrund des FRET nur die sehr geringe Quencher-Fluoreszenz aus, bindet sie allerdings an ihrer Komplementärsequenz und wird dann durch die Exonucleaseaktivität der Taq-Polymerase in 5’-3’-Richtung abgebaut, wird der Reporter abgespalten und somit freigesetzt. Der FRET verliert aufgrund der zunehmenden Entfernung seine Wirkung und das Fluoreszenzlicht mit der für den Reporter spezifischen Wellenlänge steigt an.
Dieser Anstieg wird zu Beginn einer qRT-PCR wegen der geringen DNA-Ausgangsmenge noch nicht vom Spectrophotometer detektiert. Nach ausreichender Amplifikation kann dann allerdings während des Reaktionsoptimums ein exponentieller Anstieg gemessen werden. Im Verlauf kommt es später aufgrund eines Aktivitätsverlustes der Polymerase und des Verbrauchs der Substrate zu einer Abnahme des Anstiegs, die in eine Plateauphase mündet.
Diese Floureszenzentwicklung wird als Kurve gegen die Zyklenzahl aufgezeichnet. Im Bereich der exponentiellen Steigerung oberhalb der Hintergrundfluoreszenz wird nun ein willkürlicher Fluoreszenz-Schwellenwert ausgewählt und damit eine entsprechende Zyklenzahl, auch C_T-Wert (Threshold Cycle) genannt, als Messwert festgelegt. Dieser C_T-Wert ermöglicht bei Verwendung des gleichen Fluoreszenz-Schwellenwerts nun einen Vergleich aller gemessenen Proben. Je geringer die Zyklenzahl, desto höher war die Menge der anvisierten, spezifischen mRNA in der Probe. Da weniger PCR-Durchläufe bis zum Erreichen des Schwellenwertes notwendig waren.

2.7.2. Primer- und Probe-Design

Bei dieser Arbeit standen die Expressionsprofile verschiedener Faktoren, also die Mengen der vorhandenen mRNA spezifischer Sequenzen, im Mittelpunkt des Interesses. Die entsprechenden Primersequenzen wurden so gewählt, dass sie in benachbarten Exons lagen. Dadurch wurde eine Amplifikation genomischer DNA verhindert, da die im Genom zwischen den Exons liegende Intronsequenz ein viel zu langes und damit instabiles Amplifikat für diese Form der PCR ergeben würde.
Zusätzlich kann nach Formalinfixierung eines Gewebes davon ausgegangen werden, dass die DNA und RNA durch Denaturierung in kurzen Abschnitten vorliegt. Deswegen wurden die Primer so gewählt, dass sie nur kurze, aber spezifische Amplifikate von 62 bis 146 Basenpaaren erzeugen.
Mit Hilfe der Primerdesign Software Primer-Express™ (Applied Biosystems) wurden die verwendeten Primer und Probes entworfen, von der Firma MWG Biotech in lyophilisierter Form geliefert, mit Aqua dest. in einer Konzentration von 100 µmol/l resuspendiert und bei –20℃ gelagert. Für den Gebra uch wurden die Probes in Aliquots auf eine Konzentration von 10 µmol/l verdünnt, die Primer auf 25 µmol/l. Primer- und Probesequenzen, die Annealingtemperaturen (T_m) und Größe (Bp) des gewünschten PCR-Produkts sind in Tabelle 2.12 (Seite 45) aufgeführt.

PCR-Produkt	Bp	Tm		Sequenz
GAPDH	73	66℃	FP	5'-GGGAAGCTTGTCATCAATGGA-3'
			RP	5'-CGCCCCACTTGATTTTGG-3'
			PR	5'-ATCCCATCACCATCTTCCAGGAGCG-3'
MMP-2	66	67℃	FP	5'-CGATGTCGCCCCCAAA-3'
			RP	5'-GGGCAGCCATAGAAGGTGTTC-3'
			PR	5'-CGGACAAAGAGTTGGCAGTGCAATACC-3'
MMP-7	85	70℃	FP	5'-CGGGAGGCATGAGTGAGCTA-3'
			RP	5'-GCATTTTTTGTTTCTGAGTCATAGAGA-3'
			PR	5'-AGTGGGAACAGGCTCAGGACTATCTCAAGAG-3'
MMP-9	67	68℃	FP	5'-CAGACATCGTCATCCAGTTTGG-3'
			RP	5'-CCGTCCTTCCCGTCGAA-3'
			PR	5'-CGCGGAGCACGGAGACGGGTAT-3'
MMP-11	84	65℃	FP	5'-CTGGGATAGACACCAATGAGATTG-3'
			RP	5'-TGGAGACCGCGTCAAAGG -3'
			PR	5'-TGGAGCCAGACGCCCCGC-3'
MMP-13	81	68℃	FP	5'-GATGAAGATGATTTGTCTGAGGAAGA-3'
			RP	5'-CGCGAGATTTGTAGGATGGTAGT -3'
			PR	5'-CTCCAGTTTGCAGAGCGCTACCTGAGA-3'
TIMP-1	73	70℃	FP	5'-GCAGCGAGGAGTTTCTCATTG-3'
			RP	5'-GCCACGAAACTGCAGGTAGTG-3'
			PR	5'-TGGAAAACTGCAGGATGGACTCTTGCAC-3'
TIMP-2	70	65℃	FP	5'-GCGTTTTGCAATGCAGATGT-3'
			RP	5'-CGTTTCCAGAGTCCACTTCCTT-3'
			PR	5'-TGATCAGGGCCAAAGCGGTCAGTG-3'
TIMP-3	73	68℃	FP	5'-GCTGGAGGTCAACAAGTACCAGTA-3'
			RP	5'-GCACAGCCCCGTGTACATCT-3'
			PR	5'-CTGCTGACAGGTCGCGTCTATGATGG-3'
VEGF-A	64	66℃	FP	5'-TACCTCCACCATGCCAAGTG-3'
			RP	5'-GATGATTCTGCCCTCCTCCTT-3'
			PR	5'-TCCCAGGCTGCACCCATGGC-3'
VEGF-B	71	68℃	FP	5'-CCCTGTCTCCCAGCCTGAT-3'
			RP	5'-CGCGAGTATACACATCTATCCATGA-3'
			PR	5'-CCCTGGCCACCAGAGGAAAGTGG-3'
VEGF-C	66	66℃	FP	5'-AGGAAAGAAGTTCCACCACCAA-3'
			RP	5'-GCCTTCTGGCGGTTCGT-3'
			PR	5'-CATGCAGCTGTTACAGACGGCCATG-3'
VEGF-D	80	66℃	FP	5'-CTGGAACAGAAGACCACTCTCATC-3'
			RP	5'-CTCGCAACGATCTTCGTCAAA-3'
			PR	5'-CAGGAACCAGCTCTCTGTGGGC-3'
VEGFR-1	62	42℃	FP	5'-TCACTGCCACTCTAATTGTCAATGT-3'
			RP	5'-AAACGATGACACGGCCTTTT-3'
			PR	5'-AAACCCCAGATTTAC-3'
VEGFR-2	68	64℃	FP	5'-CAAGACAGGAAGACCAAGAAAAGAC-3'
			RP	5'-GGTGCCACACGCTCTAGGA-3'
			PR	5'-TTGCGTGGTCAGGCAGCTCACA-3'
VEGFR-3	146	68℃	FP	5'-GCTGAGACCCGTGGTTCCT-3'
			RP	5'-CTATGCCTGCTCTCTATCTGCTCAA-3'
			PR	5'-ACGACCTACAAAGGCTCTGTGGACAACCA-3'
VMAT-1	82	68℃	FP	5'-TTCCTGGCACTACTGGATGGA-3'
			RP	5'-GAGTCCCCTTGGCACTCTCA -3'
			PR	5'-CACTCCAGCTTTGCATCCTACAGCCTTC-3'

Tabelle 2.12: Primer und Probes für die PCR. Angegeben sind die Sequenzen der Vorwärtsprimer (FP), der reversen Primer (RP) und der Pobes (PR), sowie die Annealingtemperatur T_m und die Größe des PCR-Produkts in Basenpaaren (Bp).

2.7.3. Praktische Durchführung

Für die qRT-PCR wurde der gebrauchsfertige Absolute™ QPCR ROX-Mix (ABgene) verwendet, der eine zunächst inaktive, Hot-Start-modifizierte DNA-Polymerase beinhaltet. Die Polymerase muss zur Aktivierung erst für 15 Min. bei 95℃ inkubiert werden. Eine solche Modifikation des Enzyms verhindert unspezifische Elongationen bei Raumtemperatur. Zudem enthält der Mastermix den passiven Referenzfarbstoff ROX (6–Carboxy–X–rhodamin).
Zur Verhinderung einer Kontamination wurden alle Materialien erst kurz vor der Verwendung aus den Originalverpackungen entnommen, Einmalhandschuhe und Pipettenspitzen mit Aerosolfiltern verwendet und in einer eigens dafür vorbehaltenen Sterilbank gearbeitet.
Der Reaktionsansatz für die qRT-PCR setzte sich pro gemessener Probe, wie folgt, zusammen:

- 12,5 µl Absolute™ QPCR ROX
- 0,5 µl Vorwärtsprimer (FP, 25µM)
- 0,5 µl Rückwärtsprimer (RP, 25µM)
- 0,5 µl Probe (10µM)
- 6 µl Aqua dest
- 5µl cDNA-Lösung

Die quantitative TaqMan® PCR wurde in einem ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) durchgeführt. Es wurde folgendes Programm zur Amplifikation eingesetzt:

Initialzyklus:	Inkubation	2 Min.	50℃
	Aktivierung	15 Min.	95℃
	Annealing	20 Sek.	58℃
	Elongation	30 Sek.	72℃
Zyklus 2-40:	Denaturierung	15 Sek.	95℃
	Annealing	20 Sek.	58℃
	Elongation	30 Sek.	72℃

Von diesem Temperaturprofil wurde nur bei der Annealingtemperatur für den Faktor VEGFR-1 auf 40℃ abgewichen.

2.7.4. Quantifizierung

Um die Messergebnisse quantifizieren zu können, wurde eine GAPDH-Plasmid-Verdünnungsreihe mit definierter Kopienzahl verwendet. Durch Ermittlung der zugehörigen Ct-Werte wurde anhand der bekannten Kopienzahlen eine Standardkurve erstellt, mit der sich anhand der jeweiligen Ct-Werte die Kopienzahl der unbekannten Proben berechnen lässt.
Aufgrund der unterschiedlichen Materialmengen der Proben sind die so gewonnenen Kopienzahlen der Zielgene zunächst nicht vergleichbar. Deswegen war zusätzlich eine Normalisierung der Ergebnisse notwendig. Dazu wurde jeweils die Kopienzahl der Glyceraldehyd–3–Phosphat–Dehydrogenase (GAPDH) in den einzelnen Proben bestimmt. Die GAPDH ist ein so genanntes „Housekeeping-Gen“, welches in jeder Zelle grundlegende Funktionen erfüllt, somit annähernd in gleicher Menge vorhanden ist und keiner Regulation durch äußere Einflüsse unterliegen sollte. Die Expression dieses Faktors bietet also ein Maß für die eingesetzte Zellmenge. Die Kopienzahlen der zu

untersuchenden Markergene wurden pro 10^6 Kopien GAPDH-mRNA angegeben (relative Expression).

2.8. Immunhistochemie und ihre Auswertung

Die Daten der qRT-PCR auf RNA-Ebene sollten auf Proteinebene durch entsprechende immunhistochemische Färbungen überprüft und bestätigt werden. Leider konnte auch nach intensiven Bemühungen keine spezifische Anfärbung der vaskulären Faktoren und ihrer Rezeptoren zufriedenstellend etabliert werden.
Um dennoch ein mikroskopisches Korrelat dieser Faktoren zu erhalten, wurde auf eine immunhistochemische Färbung der Blut- und Lymphgefässe zurückgegriffen. Dabei konnte die lymphgefäßspezifische Färbung des LYVE-1-Antikörpers erfolgreich etabliert werden. Sie wurde ebenso wie die VMAT-1-Färbung manuell gefertigt. Bei der gefäßspezifischen CD-31-Färbung und der für das Grading unerlässlichen KI-67-Färbung konnte freundlicher Weise auf die bereits etablierte automatisierte Methode des pathologischen Instituts des Klinikums rechts der Isar zurückgegriffen werden.

2.8.1. methodische Grundlagen

Bei der Immunhistochemie wird die spezifische Bindung von Antikörpern an Antigene genutzt, um Strukturen auf Proteinebene spezifisch zu lokalisieren. *In vivo* dient die Antikörper-Antigen-Bindung dem Immunsystem zur Identifizierung und Bekämpfung von Krankheitserregern.
Bei der Herstellung von Antikörpern bedient man sich zunächst meist der Immunsysteme von Säugern. Zur Immunisierung wird den Tieren das jeweilige Antigen injiziert. Daraufhin werden durch die B-Zellen entsprechende Immunglobuline (Ig) gegen diverse Epitope gebildet und ins Blut abgegeben. Die Antikörpergewinnung kann sich nun darauf beschränken, direkt das Serum mit sämtlichen Immunglobulinen zu verwenden, oder es wird eine affinitätschromatographische Aufreinigung angeschlossen. In beiden Fällen werden polyklonale Antikörper, d.h. von verschiedenen B-Zell-Klonen produzierte Immunglobuline, gegen verschiedene antigene Determinanten des Zielantigens gewonnen. Von Nachteil sind dabei mögliche Kreuzreaktionen. Durch eine Aufreinigung wird zumindest die unspezifische Hintergrundfärbung reduziert, da hierbei die Immunglobuline idealer Weise auf die spezifischen Antikörper beschränkt werden.
Bei monoklonalen Antikörpern handelt sich dagegen um Immunglobuline, die von einem einzigen B-Zellklon produziert werden. Zur Herstellung wird nach der beschriebenen Immunisierung des Tieres aus der Milz eine Einzelzellsuspension aus Lymphozyten isoliert. Diese Lymphozyten werden durch Hybridisierung mit Myelomzellen „unsterblich“ gemacht und nach Identifizierung des richtigen B-Zellklons werden aus dessen Überstand spezifische Antikörper gewonnen. Sie erkennen nur ein einziges Epitop des Zielantigens, was in der Regel eine sehr hohe Spezifität mit seltener Kreuzreaktivität und geringer Hintergrundfärbung bei guter Reproduzierbarkeit erzeugt. Allerdings sind sie gegenüber Veränderungen des Epitops, zum Beispiel durch Fixierung, empfindlich und können so zu falsch negativen Ergebnissen führen.
Es gibt verschiedene immunhistochemische Färbemethoden um zelluläre Antigene darzustellen. Dazu gehören unter anderem die direkte, die indirekte und die ABC-Methode, die jeweils Vor- und Nachteile haben. Bei der direkten Technik werden die spezifischen Antikörper selbst mit einem Markerenzym oder Fluorochrom konjugiert, was allerdings aufwendig und teuer ist und nur zu schwachen Farbsignalen führt. Deswegen werden meist, wie auch in dieser Arbeit, sensitivere Nachweismethoden gewählt, die Brückenantikörper nutzen, die spezifisch gegen die Tierspezies des

Primärantikörpers sind. Teilweise werden auch Mischungen von Sekundärantikörpern verwendet, die für unterschiedliche Tierspezies spezifisch sind.
In der bei den automatisierten Färbungen dieser Arbeit verwendeten, indirekten Methode setzt man Zweitantikörper ein, die mit einem Fluorochrom oder Markerprotein, in diesem Fall Peroxidase, versehen wurden. Bei der ebenso hier eingesetzten ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) ist der Brückenantikörper mit dem wasserlöslichen Vitamin Biotin gekoppelt. Avidin, bzw. das modernere, gentechnisch hergestellte Streptavidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin und bildet mit einem biotinyliertem Enzym den ABC-Komplex, der an dem biotinylierten Sekundärantikörper bindet. Bei diesem Enzym kann es sich um alkalische Phosphatase oder, wie hier, um Peroxidase handeln. Das Enzym wird aus der Wurzel des Meerrettichs (Horseradish Peroxidase, HRP) gewonnen und bildet zusammen mit einem Substratpuffer, H_2O_2 als Katalysator und einem Chromogen, hier 3,3Diaminobenzidin (DAB), ein farbiges Endprodukt.
Im Vorfeld der eigentlichen Färbung sind häufig einige Prozeduren zur Demaskierung des Antigens und Verhinderung von unspezifischen Anfärbungen notwendig. Durch Formalinfixierung eines Gewebes entstehen zum Beispiel Aldehydvernetzungen, die eine Antikörperbindung verhindern können. Zur Reaktivierung der Epitope gibt es einige Techniken. Einerseits können Enzyme, wie das Trypsin, genutzt werden, andererseits kann auch die Hitzedemaskierung in unterschiedlichen Puffern, zumeist auf Citratbasis, zielführend sein. Es gibt mannigfaltige Ursachen für unspezifische Färbungen. Die hier angeführten Methoden zur Vermeidung dieser Artefakte beschränken sich auf die in dieser Arbeit angewendeten Techniken. Oft ist beispielsweise eine Blockade der endogenen Peroxidaseaktivität durch eine Inkubation mit 0,3% bis 3% Wasserstoffperoxid (H_2O_2), ebenso wie ein Avidin-Biotin-Block notwendig. Die Inkubation mit dem Normalserum der Spezies, aus der der Sekundärantikörper stammt, dient zur Absättigung elektrostatischer Ladungen im Gewebe und verhindert somit ebenfalls eine unspezifische Färbung.

Primärantikörper:		
polyklonaler IgG-Kaninchen-anti-human-VMAT-1-Antikörper	1:1000	(Biotrend)
monoklonaler Maus-anti-human-CD-31-Antikörper für Klon JC-70-A	1:30	(Dako ChemMate)
monoklonaler Maus-anti-human-Ki-67-Antikörper für Klon MIB-1	1:100	(Dako ChemMate)
polyklonaler IgG-Ziege-anti-human-LYVE-1-Antikörper	1:150	(R&D Systems)
Sekundärantikörper:		
biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper	1:500	(Dianova)
biotinylierter Kaninchen-anti-Ziege-Antikörper	1:150	(Vector)
Universal HRP Multimer aus Universal DAB Detection Kit		(Ventana)
(Mixtur HRP-gelabelter Ziege-anti-Maus-IgG-, Ziege-anti-Maus-IgM-, Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper)		

Tabelle 2.13: Antikörper zur Immunhistochemie

2.8.2. VMAT-1

Der vesikuläre Monoamin-Transporter-1 (VMAT-1) ist ein integraler Bestandteil in der Membran sekretorischer Vesikel von neuronalen und endokrinen Zellen [106]. In dieser Arbeit ist er aufgrund seines Vorkommens in enterochromaffinen Zellen, die den Ursprung ilealer Karzinoide bilden, von besonderem Interesse. VMAT-1 wurde daher als Markerprotein zur Diagnosebestätigung verwendet.
Zur immunhistologischen Färbung wurden die in Tabelle 2.13 (Seite 48) und Tabelle 2.14 (Seite 49) angegebenen Antikörper und Reagenzien in folgendem Protokoll verwendet.

Demaskierungslösung	Antigen Unmasking Solution	(Vector)
Blockierungslösungen		
Wasserstoffperoxid	H2O2 30% reinst Ph.Eur., USP	(AppliChem)
Methanol	zur Analyse	(AppliChem)
Ziegen-Normalserum	Normal Goat Serum	(Vector)
Kaninchen-Normalserum	Normal Rabbit Serum	(Vector)
Avidin/Biotin Blocking Kit	Avidin D-Lösung	(Vector)
	Biotin-Lösung	
Streptavidin Peroxidase	ABC Reagent:	(Vector)
	Avidin DH Lösung	
	HRP biotinyliert	
Chromogen Substratlösung		
Detektion Kit:	HRP Substrate Buffer: Hydrogenperoxid	(Dako)
	DAB–Lösung: Diaminobenzidin	
TRIS-HCl	0,05M, pH 7,6	(Rockland Im.)
Gegenfärbemittel	Mayer's Hämatoxylin-Lösung	(AppliChem)
Eindeckmedien	Pertex	(medite)
	Entellan	(Merck)
Puffer, Verdünnungs- und Waschlösungen		
siehe unter 2.2.1. Puffer		

Tabelle 2.14: Reagenzien für VMAT-1- und LYVE-1-Imunhistochemie

- Deparaffinierung der Gewebeschnitte
  - Xylol 4x 5 Min.
  - Isopropanol 100% 2x 5 Min.
  - Isopropanol 96% 1x 5 Min.
  - Isopropanol 80% 1x 5 Min.
  - Isopropanol 70% 1x 5 Min.
  - PBS
- Umrandung des Gewebes mit einem Fettstift zur Minimierung der benötigten Antikörpermenge
- Blockierung der endogenen Peroxidase mit 10% Methanol und 0,3% H_2O_2 in PBS für 10 Min. bei RT auf Schüttler
- 3x Waschen mit PBS für je 5 Min. bei RT auf Schüttler
- Antigendemaskierung mit 10mM Citratpuffer (pH 6,0) in Dampfkochtopf mit Mikrowelle für 15 Min. bei 800W, dann für 15 Min. bei 400W erhitzen, anschließen in Citratpuffer für 20 Min. bei RT abkühlen
- dreimaliges Waschen mit PBS für je 5 Min. bei RT auf Schüttler
- Inkubation des Gewebeschnittes mit 5% Ziegen-Normalserum in PBS für 30 Min. bei RT auf dem Schüttler
- Inkubation bei 4℃ über Nacht mit Primärantikörper aus Kaninchen gegen humanes VMAT-1 1:1000 verdünnt in PBS mit 5% Ziegen-Normalserum
- 3x Waschen mit PBS für je 5 Min. bei RT auf Schüttler
- Inkubation mit Sekundärantikörper aus Ziege gegen Kaninchen 1:500 verdünnt in PBS mit 5% Ziegen-Normalserum für 2 Std. bei RT auf Schüttler
- 3x Waschen mit PBS für je 5 Min. bei RT auf Schüttler
- ABC-Reagenz laut Herstellerangaben vorbereiten, auftragen und bei RT für 2 Std. auf Schüttler inkubieren

- 2x Waschen mit PBS und einmalig mit TRIS für je 5 Min. bei RT auf Schüttler
- Visualisierung der Immunoreaktion durch 0,1% DAB-Lösung in 0,05 M TRIS-HCL (pH 7,6) mit 0,01% H_2O_2 bei RT unter Mikroskop für circa 1-5 Min.
- 1x Waschen mit Aqua dest
- Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe
- Eindecken mit Entellan-Eindeckmedium

2.8.3. LYVE-1

LYVE-1 ist ein lymphatischer Rezeptor für Hyaluron, einem Muccopolysaccharid der extrazellulären Matrix [200]. Im Gegensatz zu CD-31, das charakteristisch für Gefäßendothelzellen im Allgemeinen ist, ist dieser Rezeptor spezifisch für die Endothelzellen von Lymphgefässen und erlaubt somit deren gezielte immunhistochemische Anfärbung (vergleiche Abbildung 2.4 S.51 und Abbildung 2.5 S.52). Es wurde dazu unter Verwendung der Antikörper und Reagenzien in Tabelle 2.13 (Seite 48) und Tabelle 2.14 (Seite 49) folgendes Arbeitsprotokoll etabliert:

- Vorwärmen der Gewebeschnitte für 12h bei 59℃ im B rutschrank
- Entparaffinierung des Gewebes
    - Xylol 15 Min.
    - Isoropanol 10 Min.
    - Ethanol 90% 5 Min.
    - Ethanol 70% 5 Min.
    - H_2O
- Zur Antigendemaskierung in einer Antigen Unmasking Solution (Vector) in einer Mikrowelle für 2 Min. bei 800 W aufkochen, dann für 20 Min. bei 360 W weiter erhitzen, anschließend in Demaskierungslösung für 15 Min. bei RT abkühlen
- 1x Waschen in PBS
- Blockade der endogenen Peroxidase in 3% H_2O_2 –Lösung für 10 Min.
- 3x Waschen in PBS
- Umrandung des Gewebes mit einem Fettstift
- Biotinblock mit Avidin D-Lösung für 15 Min. bei RT, anschließend spülen mit PBS
- Avidinblock mit Biotinlösung kombiniert mit 5% Kaninchen-Normalserum für 60 Min. bei RT, keinen Waschschritt anschließen
- Inkubation mit Ziege-antihuman-LYVE-1-Erstantikörper 1:150 verdünnt in PBS mit 1% Kaninchen-Normalserum für 60 Min. bei RT, dann waschen mit PBS
- Inkubation mit biotinyliertem Kaninchen-anti-Ziege-Zweitantikörper 1:150 in 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,8) mit 0,15 M NaCl für 25 Min. bei RT, anschließend spülen mit PBS
- Inkubation mit Streptavidin Peroxidase für 25 Min. bei RT, danach spülen mit PBS
- Färbung mit DAB-Reagenz für 1 Min., dann spülen mit PBS
- Gegenfärbung mit Hämatoxylin, anschließend unter fließendem Wasser bläuen
- Entwässerung in ansteigender Alkoholreihe
- Eindecken mit Pertex-Eindeckmedium

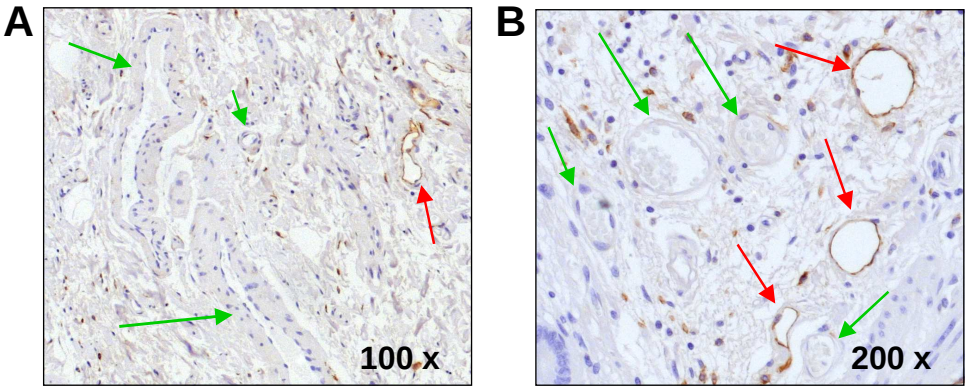


Abbildung 2.4: Immunhistochemische LYVE-1-Lymphgefäßfärbung. Abgebildet sind immunhistochemisch mit einem LYVE-1-Antikörper behandelte Gewebeschnitte. Gefäße deren Endothel eine LYVE-1-positive Reaktion im Sinne einer braun Färbung zeigten wurden als Lymphgefäße definiert (rote Pfeile) und LYVE-1-negative Gefäße, in deren Lumen teilweise Blutzellen zu finden sind, als Blutgefäße (grüne Pfeile). Bild **A** zeigt neben Lymphgefässen größer lumige Blutgefäße mit Muskularis bei einer 100-fachen mikroskopischen Vergrößerung. Auf Bild **B** sind bei einer 200-fachen Vergrößerung Kapillaren mit Blutzellen im Lumen neben positiv gefärbten Lymphgefäßen abgebildet.

2.8.4. Automatisierte CD-31-und MIB-1-Färbung

Das KI-67-Protein ist ein nukleäres Markerprotein für in Teilung befindliche Zellen und ermöglicht so eine immunhistochemische Evaluation der Proliferation in einem Gewebe. Bevorzugt wird in diesem Zusammenhang das Epitop MIB-1 als Antigen genutzt [53]. CD-31 (PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule) ist ein endotheliales Markerprotein und ermöglicht immunhistochemisch die Visualisierung von Gefäßen (siehe Abbildung 2.5, S.52). Für beide Marker existierten im pathologischen Institut des Klinikums rechts der Isar bereits etablierte, automatisierte Färbungen, auf die freundlicher Weise bei dieser Arbeit zurückgegriffen werden konnte. Die für das Ventana BenchMark Färbemodul (Ventana) verwendeten Reagenzien und Antikörper sind in Tabelle 2.13 (Seite 48) und Tabelle 2.15 (Seite 51) aufgeführt und die Methode ist im Anschluss beschrieben. Die zahlreichen Waschschritte und Zugaben der Coverslip-Lösung werden nicht im Detail aufgeführt.

ultraView Universal DAB Detection Kit		(Ventana)
Inhibitor	3% H_2O_2-Lösung	
Universal HRP Multimer	Mixtur HRP-gelabelter Sekundärantikörper	
DAB Chromogen	Diaminobenzidinlösung	
DAB H_2O_2	Phosphatpuffer mit 0,04% H_2O_2	
Copper	Acetatpuffer mit Kupfersulfat (5g/l)	
EZ Prep	10x Detergenz	(Ventana)
Reaction Buffer	10x	(Ventana)
Liquid Coverslip (LCS)	(High temperatur)	(Ventana)
Cell Conditioning 1 (CC1)		(Ventana)
Hematoxylin Counterstain 1		(Ventana)
Bluing Reagent		(Ventana)

Tabelle 2.15: Reagenzien für Immunhistochemie mit Ventana BenchMark

- Deparffinierung des Gewebeschnitts mittels Hitze für jeweils 4 Min. bei 75℃ und 74℃ unter Verwendung des Detergenzes EZ P rep zur Minderung der Oberflächenspannung
- Antigendemaskierung mit CC1-Lösung für 8 Min. bei bis zu 95℃, für 30 Min. bei bis zu 100 ℃ und bei CD-31-Färbung nochma ls für 60 Min. bei RT
- Inkubation für 2 Min. bei 37℃ mit Reaktion Buffer
- Blockierung der endogenen Peroxidase mit Inhibitor-Lösung für 4 Min. bei RT
- Inkubation mit jeweiligem Primärantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Tabelle 2.13, S. 48) bei RT für 20 Min. bei MIB-1, bzw 28 Min. bei CD-31
- Inkubation mit Sekundärantikörpermischung HRP Univ Mild für 8 Min. bei RT
- Inkubation mit DAB- und DAB H_2O_2 –Lösungen für 8 Min. bei RT zur Visualisierung
- Inkubation mit Copper-Lösung für 4 Min. bei RT
- Gegenfärbung mit Counterstain-1-Lösung für 8 Min. bei RT
- Bläuen des Präparats mit Bluing Reagent für 4 Min. bei RT durch pH-Steigerung des Waschpuffers

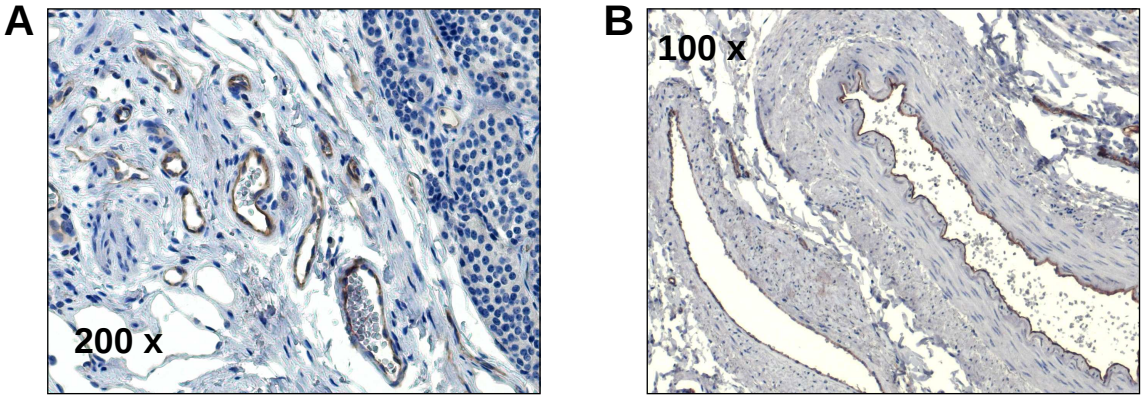


Abbildung 2.5: Immunhistochemische CD-31-Gefäßfärbung. Abgebildet sind immunhistochemisch mit einem CD-31-Antikörper behandelte Gewebeschnitte. Bild **A** zeigt bei einer 200-fachen mikroskopischen Vergrößerung Kapillaren mit Blutzellen im Lumen, Bild **B** bei einer 100-fachen Vergrößerung größer lumige Gefäße mit Muskularis. Die Endothelien zeigen jeweils eine spezifische CD-31-posive (braune) Reaktivität.

2.8.5. KI-67-Index

Zur Bestimmung des KI-67-Indexes wurde zunächst eine immunhistochemische Färbung der Primärtumore mit einem MIB-1-Antikörper durchgeführt (siehe 2.8.4). Die Zellkerne proliferierender Zellen werden hierbei deutlich braun angefärbt. Danach wurden mikroskopisch jeweils mindestens 2000 Tumorzellen in Bereichen der höchsten, nukleären Anfärbung ausgezählt und der Prozentsatz an MIB-1 positiven Zellen bestimmt. Dieser Prozentsatz stellt den KI-67-Index dar, der das Grading der Karzinoide ermöglicht. Auf die Gradeinteilung der Tumore nach aktuellen Vorgaben wird im Abschnitt 2.4.2.3 (Seite 34) genau eingegangen.

2.8.6. Bestimmung der Gefäßdichte

Zur Evaluation der mikrovaskulären Dichte (Micro Vessel Density, MVD) der Primärtumore auf CD-31 gefärbten Gewebeschnitten, wurde die Methode nach Weidner eingesetzt. Dabei wird jede braun gefärbte Endothelzelle bzw. jeder braungefärbte Zellkluster, der klar von benacharten Mikrogefäßen, Tumorzellen und anderen Bindegewebselementen abgegrenzt werden kann, als einzelnes Mikrogefäß gezählt [527]. Es wurden von jedem Primärtumor, unterschieden in Tumorperipherie und Tumorzentrum, abhängig von der Tumorgröße wurden bei einer 200-fachen Vergrößerung insgesamt mindestens 20 Bilder mittels einer an ein Mikroskop angeschlossenen Kamera von unselektierten Feldern gemacht. Ein Feld maß hierbei 0,1496 mm^2. Die Zahl CD-31 positiver Strukturen wurde auf jedem Bild gezählt und die mikrovaskuläre Dichte (MVD) jedes Primars als durchschnittliche Anzahl pro $1mm^2$ errechnet.
Entsprechend wurde bei der Evaluation der Lymphgefäßdichte in LYVE-1 gefärbten Tumoren verfahren. Hier wurde jeweils gesondert eine intratumorale Lymphgefäßdichte (ITL) im Tumorzentrum und eine peritumorale Lymphgefäßdichte (PTL) im Randbereich des Tumors bestimmt.

2.9. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden als Mittelwert ± SEM (standard error of means, Standardfehler) angegeben. Um statistisch signifikante Unterschiede zu finden, wurden die Daten abhängig des Zusammenhangs mit Hilfe des Mann-Whitney-Rank-Sum-Tests, des Log-Rank-Tests für Überlebensanalysen in Kaplan-Meier-Kurven und der Spearman-Korrelation analysiert. In den Box-Plots entsprechen die Boxen dem Median bzw. der 25./75. Perzentile, die Whiskers der 10./90. Perzentile und die gefüllten Kreise der 5./95. Perzentile. P-Werte ≤ 0,05 wurden als signifikant erachtet [166]. Die Statistiken und Graphen wurden mit Hilfe der Computerprogramme SigmaStat und SigmaPlot (Systat Software) erstellt.

Die Grenze zwischen hoher und niedriger Expression eines Parameters musste virtuell gesetzt werden. Aufgrund der Datenlage entschied man sich dabei für den Mittelwert zwischen den jeweiligen Mittelwerten der M0-Gruppe und der M1-Gruppe. Die Einteilung in Tumoren niedriger bzw. hoher Vaskularisierung orientierte sich am Median der jeweiligen Gefäßdichte. Wobei der mediane Wert der Gruppe der hoch vaskularisieten Karzinoide zugeschlagen wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Bestimmung des Ki-67 Indexes zur Graduierung des Primars

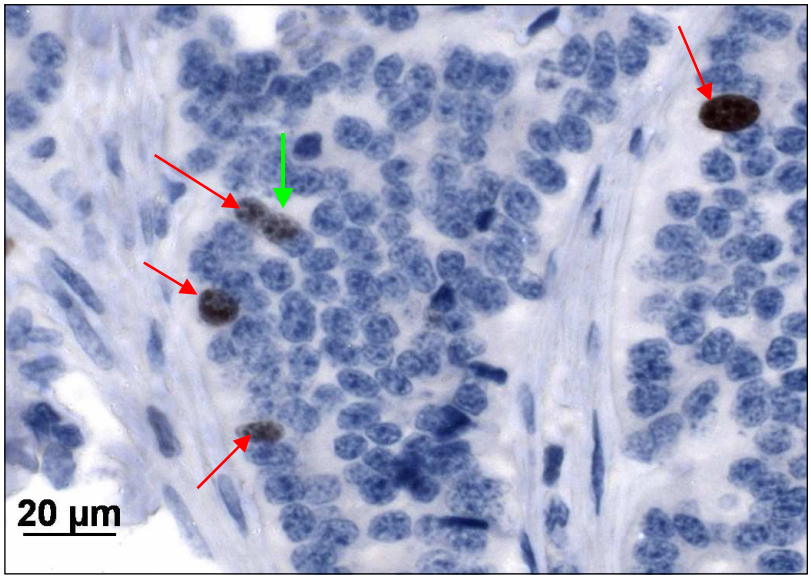


Abbildung 3.1: Immunhistochemischer Nachweis von MIB-1 in primären Ileumkarzinoiden. Immunhistochemie des Gewebeschnitts eines repräsentativen primären Ileumkarzinoids. Die roten Pfeile markieren die MIB-1-positiv gefärbten Zellkerne von sich in Proliferation befindlichen Zellen. Der grüne Pfeil zeigt einen in Zellteilung befindlichen Kern. Vergrößerung 400-fach.

Pat #	KI-67-Index	Grading
1	1,1	1
2	2,7	2
3	0,7	1
4	0,9	1
5	2,6	2
6	2,0	1
7	0,4	1
8	2,9	2
9	1,4	1
10	1,6	1
11	1,7	1
12	0,4	1
13	1,9	1
14	1,1	1
15	2,4	2
16	1,1	1
17	0,8	1
18	2,3	2
19	1,7	1
20	2,0	1
21	2,0	1
22	1,3	1
23	2,1	2
24	1,0	1
25	1,6	1

Tabelle 3.1: KI-67-Index und Grading. Angegeben ist der KI-67 Proliferationsindex in Prozent und die resultierende Graduierung des Tumors für die primären Ileumkarzinoide der Studie.

Für eine korrekte und vollständige histopathologische Evaluation der Ileumkarzinoide, wurde nachträglich in den Primärtumoren aller Patienten der Proliferationsmarker MIB-1 immunhistochemisch dargestellt (Abbildung 3.1; Methodik unter 2.8.4). Es handelt sich dabei um das am besten charakterisierte Epitop des KI-67-Proteins und wird zur Bestimmung des KI-67-Index genutzt (Methodik unter 2.8.5). Dieser Index gibt Auskunft über den prozentualen Anteil proliferierender Zellen im Tumor. Dazu wurden jeweils mindestens 2000 Tumorzellen in möglichst hochproliferativen Bereichen des Primars ausgezählt. Die folgende Graduierung orientierte sich nach aktuellen Leitlinien für Karzinoide des Mitteldarms [411] (siehe auch Unterpunkt 2.4.2.4). Entsprechend der guten Differenzierung der eingeschlossenen Tumore und der allgemein geringen

Wachstumsrate der Ileumkarzinoide konnten nur niedrige Indices <3% evaluiert werden. Die Graduierung ging somit nicht über Grad 1 mit einem KI-67-Index < 2% bei 19 Patienten und Grad 2 mit einem KI-67-Index zwischen 2% und 20% bei sechs Patienten hinaus.

3.2. VMAT-1 als Marker für ileale Karzinoide

Zur Bestätigung des EC-Zell-Ursprungs der untersuchten Tumore wurde der Marker VMAT-1 genutzt. Unter Einsatz von qRT-PCR und Immunhistochemie wurde der spezifische vesikuläre Transporter sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene nachgewiesen.

3.2.1. VMAT-1-m-RNA-Expression

Die VMAT-1-Expressionsniveaus der primären Ileumkarzinoide und der Negativkontrollen aus dem Duodenum wurden miteinander verglichen (Daten nicht gezeigt). Die Werte der relativen Expression befanden sich bei den ilealen Primaren im Bereich zwischen 10^3 und 10^6 im deutlichen Kontrast zu mittleren zweistelligen Werten in den duodenalen Tumoren.

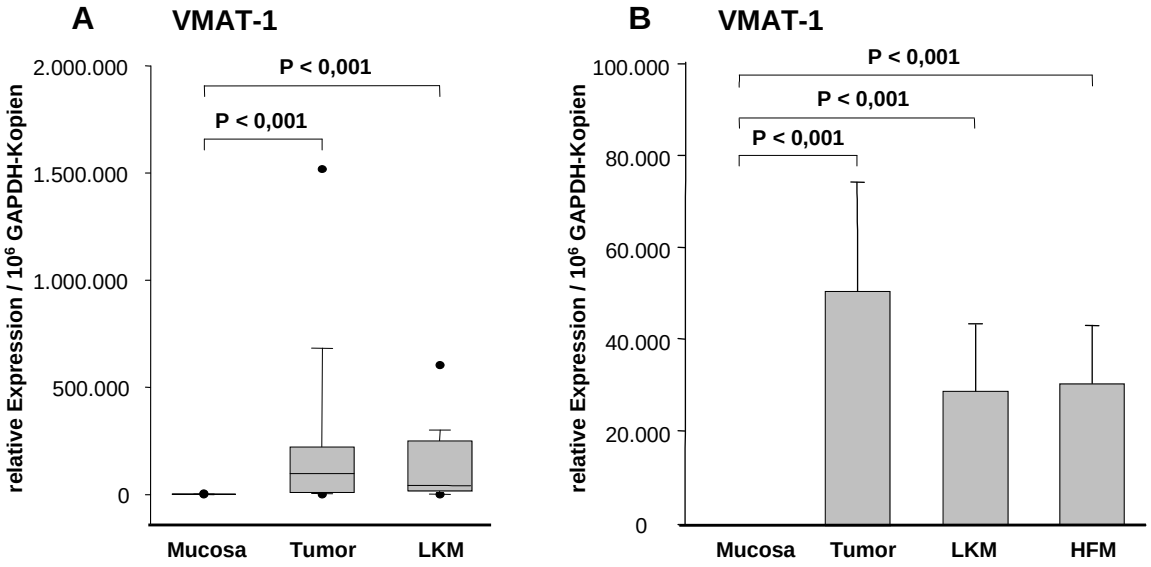


Abbildung 3.2: VMAT-1-Expressionsprofil in Primärtumoren, Metastasen und normaler Mukosa des Ileums. A: Box-Plot-Darstellung der Expressionsprofile für VMAT-1 der gesunden ilealen Schleimhäute (Mukosa, n = 25), der Primärtumore (Tumor, n = 25) und der Lymphknotenmetastasen (LKM, n = 24). Boxen entsprechen dem Median bzw. der 25./75. Perzentile, Whiskers der 10./90. und gefüllte Kreise der 5./95. Perzentile. **B:** Expressionsniveaus der M1-Patientengruppe in Mukosa (n = 10), Tumor (n = 10), LKM (n = 9) und den hepatischen Fernmetastasen (HFM, n = 8). Mittelwerte ± SEM. mRNA-Mengen wurden mittels quantitativer real-time RT-PCR ermittelt und nach Normalisierung mit 10^6 GAPDH mRNA-Kopien als relative Expression dargestellt. Signifikante P Werte sind angegeben und wurden mittels Mann-Whitney Rang Summen-Test errechnet.

Ebenso eindeutig zeigt sich auch der Expressionsunterschied zur normalen Mukosa (Abbildung 3.2). Die Expressionsniveaus sowohl in den Primärtumoren des Ileums, als auch in den Lymphknotenmetastasen waren für die gesamte Studiengruppe signifikant erhöht (Abbildung 3.2 A). Entsprechendes konnte für die kleinere Subgruppe M1 mit Fernmetastasen in der Leber gezeigt werden. Auch hier war die relative Expression im Primar, in den lymphatischen und zusätzlich in den hepatischen Filiae im Vergleich zur Schleimhaut signifikant gesteigert (Abbildung 3.2 B). Allerdings konnte keine Korrelation der VMAT-1-Expression in den Primärtumoren und der gesunden „gematchten“ Mukosa des entsprechenden Patienten nachgewiesen werden. Trotz der leicht, im Vergleich zu den Primärtumoren nicht signifikant erniedrigten Werten zeigte sich in den Metastasen deutlich eine starke Expression des Markers VMAT-1.

Bei einem direkten Vergleich der Expressionsdaten für VMAT-1 in den Primärtumoren mit den immunhistochemischen Ergebnissen für die etablierten EC-Zell-Marker Serotonin und Substanz P aller Patienten konnte kein proportionaler Zusammenhang zwischen Expressionsniveau und Anfärbbarkeit gefunden werden.

3.2.2. Immunhistochemische VMAT-1-Färbung

Zur Kontrolle der durch qRT-PCR ermittelten Expressionsdaten wurde der Marker VMAT-1 mittels Immunhistochemie auch auf Proteinebene nachgewiesen. Dabei zeigte sich ein Zusammenhang zwischen mRNA-Expression und Proteinexpression von VMAT-1 im Gewebe (Abbildung 3.3). Normale Mukosa (Abbildung 3.3 A) wies, wie zu erwarten, nur vereinzelte VMAT-1-positve EC-Zellen auf; wohingegen Primärtumoren (Abbildung 3.3 B) und Metastasen mit EC-Zellursprung in Lymphknoten (Abbildung 3.3 C) und Leber (Abbildung 3.3 D) eine stark positive Färbung für VMAT-1 zeigten. Besonders eindrucksvoll ist hier der Unterschied zum jeweils benachbarten Normalgewebe.

Im Gegensatz zum Ileumkarzinoid konnte in einem Karzinoid mit Ursprung im Duodenum (Abbildung 3.3 E) entsprechend der fehlenden VMAT-1-Expression auf m-RNA-Ebene auch kein VMAT-1-Protein im Gewebe nachgewiesen werden.

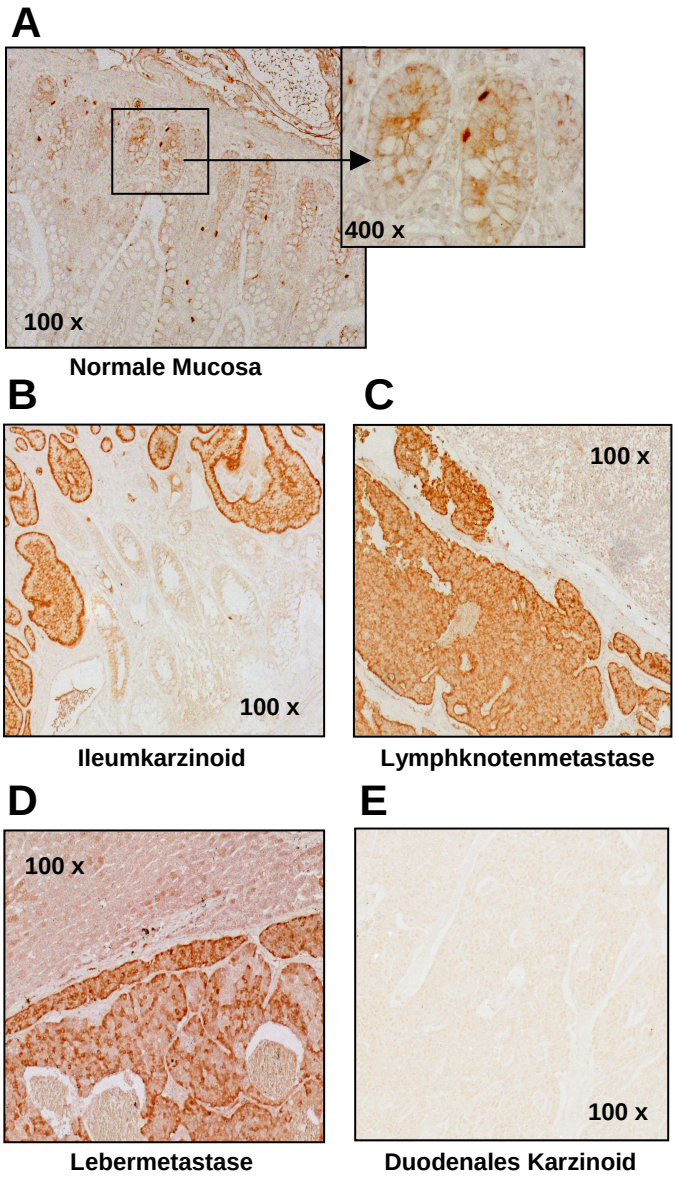


Abbildung 3.3: Immunhistochemische Darstellung der VMAT-1 Expression in verschiedenen Geweben. **A**: Gesunde Mukosa des Ileums mit normalen EC-Zellen, deren Zellbasis deutlich VMAT-1-postiv (braun) gefärbt ist. **B**: Randbereich eines primären EC-Zellkarzinoids des Ileums. **C**: Lymphknotenmetastase eines EC-Zellkarzinoids mit angrenzendem Normalgewebe. **D**: Normales Lebergewebe und Lebermetastase eines EC-Zellkarzinoids. **E**: Karzinoid des Duodenums mit fehlender Anfärbbarkeit für VMAT-1. Verwendete Vergrößerungen sind in den Einzelbildern angegeben.

3.3. Auswertung klinischer und histopathologischer Daten

In der Studie wurden auch klinische und histopathologische Daten anhand des vorhandenen Aktenmaterials erhoben, statistisch ausgewertet und hinsichtlich eines möglichen Einflusses aufeinander untersucht. Tabelle 3.2 zeigt eine Auswahl der Häufigkeitsverteilungen klinischer bzw. pathologischer Parameter in den Gruppen mit unterschiedlichen Metastasierungsstadien, mit Tumoren unterschiedlicher Größe und Graduierung, sowie deren statistischen Zusammenhang.

Eine Lebermetastasierung korrelierte statistisch signifikant mit dem Nachweis erhöhter HIES-Werte im Urin, mit dem Auftreten von Flush-Attacken, mit der Entscheidung für eine adjuvante Therapie und mit dem Durchmesser des Primärtumors. Eine nicht signifikante Tendenz zeigte sich mit steigendem T-Stadium. Es fand sich keine alters- oder geschlechtsabhängige Korrelation mit dem Auftreten von Fernmetastasierung,

ebenso gab es keinen Zusammenhang mit sonstigen Symptomen, der Tumorgraduierung und multipler Tumorverteilung. Insbesondere wurde auch ein möglicher Zusammenhang zwischen den absoluten KI-67-Index-Werten und dem Metastasierungsstatus untersucht (nicht gezeigt), da die Existenz von Fernmetastasen zumeist Hinweis auf eine höhere Aggressivität des Tumors geben und somit mit einer höheren Proliferation der Tumorzellen einhergehen kann. Allerdings konnte hier keinerlei Unterschied zwischen Primaren mit bekannter Fernmetastasierung und solchen mit lokal begrenzter Metastasierung gefunden werden.

		Metastasierung			**max. Tumordurchmesser**				**Graduierung**		
Parameter	**n**	**N1M0**	**N1M1**	**P-Wert**	**≤ 10mm**	**10-20mm**	**> 20mm**	**P-Wert**	**G1**	**G2**	**P-Wert**
max. Durchmesser											
≤ 10mm	5	5(33%)	0(0%)	**0,0012**					4(21%)	1(17)	0,999
10-20mm	11	8(53%)	3(30%)						8(42%)	3(50%)	
> 20mm	9	2(13%)	7(70%)						7(37%)	2(33%)	
Graduierung											
G1	19	12(80%)	7(70%)	0,581	4(80%)	8(73%)	7(78%)	0,999			
G2	6	3(20%)	3(30%)		1(20%)	3(27%)	2(12%)				
G3	0	0(0%)	0(0%)		0(0%)	0(0%)	0(0%)				
T-Stadium											
T1	3	3(20%)	0(0%)	0,052	3(60%)	0(0%)	0(0%)	**0,0125**	2(11%)	1(17%)	0,45
T2	10	6(40%)	4(40%)		1(20%)	5(45%)	4(44%)		7(37%)	3(50%)	
T3	6	5(33%)	1(10%)		1(20%)	5(45%)	0(0%)		5(26%)	1(17%)	
T4	6	1(7%)	5(50%)		0(0%)	1(9%)	5(56%)		5(26%)	1(17%)	
Multiplizität											
singulär	17	10(67%)	7(70%)	0,955	4(80%)	6(54%)	7(78%)	0,804	12(63%)	5(83%)	0,373
multipel	8	5(33%)	3(30%)		1(20%)	5(46%)	2(22%)		7(37%)	1(17%)	
HIES-Spiegel											
normal	5	5(71%)	0(0%)	**0,0037**	1(33%)	3(60%)	1(20%)	0,541	5(50%)	0(0%)	0,132
erhöht	8	2(29%)	6(100%)		2(67%)	2(40%)	4(80%)		5(50%)	3(100%)	
Flush-Anfälle											
negativ	13	10(100%)	3(33%)	**0,0001**	4(100%)	6(75%)	3(43%)	**0,043**	12(80%)	1(25%)	**0,036**
positiv	6	0(0%)	6(67%)		0(0%)	2(25%)	4(57%)		3(20%)	3(75%)	
Diarrhö											
negativ	8	6(60%)	2(22%)	0,104	2(50%)	4(50%)	2(29%)	0,435	6(40%)	2(50%)	0,732
positiv	11	4(40%)	7(78%)		2(50%)	4(50%)	5(71%)		9(60%)	2(50%)	
Schmerz											
negativ	7	3(30%)	4(50%)	0,411	0(0%)	4(50%)	3(50%)	0,175	5(36%)	2(50%)	0,621
positiv	11	7(70%)	4(50%)		4(100%)	4(50%)	3(50%)		9(64%)	2(50%)	
adjuvante Therapie											
negativ	12	9(90%)	3(33%)	**0,0084**	4(100%)	6(75%)	2(29%)	**0,0097**	11(73%)	1(25%)	0,081
positiv	7	1(10%)	6(67%)		0(0%)	2(25%)	5(71%)		4(27%)	3(75%)	

Tabelle 3.2: Häufigkeitsverteilung ausgewählter klinischer und pathologischer Parameter. Auflistung der Verteilung in Patientengruppen mit unterschiedlichem Metastasierungsstatus (N1M0 = lokale Metastasierung, N1M1 = Fernmetastasierung), mit unterschiedlichem Tumordurchmesser (Tumoren ≤ 10mm, >10mm aber ≤ 20mm oder >20mm) oder mit unterschiedlicher Graduierung (G1 oder G2) unter Berücksichtigung verschiedener Parameter (Tumorgröße, Graduierung, T-Stadien, singuläre bzw multiple Tumoren, HIES-Spiegel im Urin, Auftreten von Flush-Attacken, Diarrhö oder Schmerzen und Anwendung adjuvanter Therapien). P-Werte wurden mit Hilfe einer Spearman Korrelation ermittelt. Bei Parametern mit gesamt n < 25 fehlten vollständige Angaben in den Akten.

Im Einzelnen wurde in der M1-Gruppe bei jeder durchgeführten Untersuchung ein erhöhter HIES-Spiegel gefunden und bei 60% der Patienten typische Flush-Symptome. Im Vergleich dazu wurden bei Patienten ohne Fernmetastasen nur „fragliche“ Flush-Anfälle (Zitat der Aufzeichnungen in den Akten) angegeben, die retrospektiv nicht als Flush bestätigt werden konnten.

Der Tumordurchmesser zeigte eine signifikant positive Korrelation mit dem Auftreten von Flush-Anfällen, dem Einsatz adjuvanter Therapien, dem T-Stadium und, wie oben angeführt, der Fernmetastasierung. Dagegen konnte die T-Stadieneinteilung, abgesehen von der bereits erwähnten Korrelation mit dem Tumordurchmesser und der Tendenz zur Lebermetastasierung in höheren T-Stadien, weder mit klinischen, noch mit histopathologischen Daten signifikant korreliert werden. Eine singuläre bzw. multiple Verteilung des Tumors im Ileum zeigte keinen Zusammenhang mit klinischen oder histopathologischen Daten.

Die Graduierung der Tumordifferenzierung korrelierte nicht mit histopathologischen Daten. Ein signifikanter Zusammenhang des G2-Stadiums konnte mit der Flush-Symptomatik und dem Hedinger-Syndrom gefunden werden. Signifikante Zusammenhänge waren auch bei einem direkten Vergleich mit dem Proliferationsindex in Prozentzahlen nicht zu finden, was ebenfalls auf eine Aufteilung in Tumoren mit einem KI-67-Index $\leq 1\%$ bzw. $> 1\%$ zutraf.

Patienten, bei denen nach Operation Residuen zurückblieben, zeigten signifikant häufiger eine Flush-Symptomatik, sowie eine Fernmetastasierung. Ebenso korrelierten erhöhte HIES-Werte im 24h- Urin signifikant mit einer Lebermetastasierung, sowie dem Auftreten von Diarrhöen. Adjuvante Therapien kamen signifikant häufiger bei Fernmetastasierung, großem Tumor und Flush-Symptomatik zur Anwendung.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ein Teil der Symptome signifikant mit klinischen oder histopathologischen Parametern korrelierte. Eine positive HIES-Urindiagnostik war meist mit dem Auftreten von Diarrhöen verbunden. Flush-Anfälle korrelierten mit einem größeren Tumordurchmesser, einem höheren Grading und einer Fernmetastasierung, sowie der Anwendung von adjuvanten Therapien.

Das Alter bei operativer Entfernung des Primars und das Geschlecht der Patienten zeigten keinen Zusammenhang mit irgendeinem klinischen oder pathologischen Parameter.

3.4. Vergleich der Expressionsprofile

Zur Untersuchung des Expressionsverhaltens maligner EC-Zellen wurden die Expressionswerte der neoplastischen Proben und der normalen Ileumschleimhäute miteinander verglichen.

3.4.1. Gesamtgruppe

Zunächst wurden die Expressionswerte in normaler Mukosa, im Primärtumor und in den Lymphknotenmetastasen für die gesamte Studiengruppe (n=25) verglichen. Die Ergebnisse für die Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren sind in Abbildung 3.4 dargestellt.

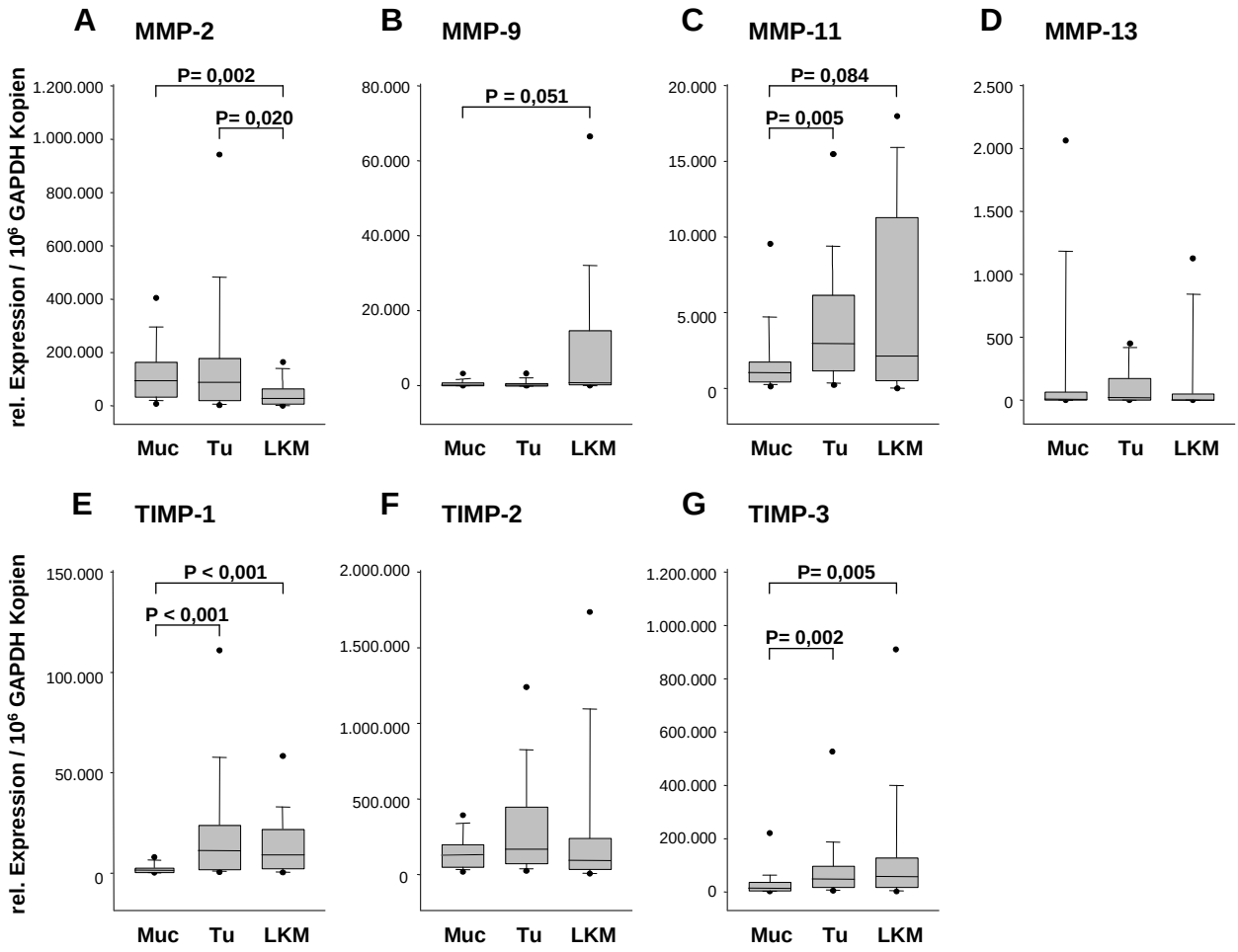


Abbildung 3.4: Expressionsniveau der Matrixmetalloproteinasen (MMP) und ihrer Inhibitoren (TIMP). Die Grafik zeigt einen Überblick der Expression von MMP-2 (**A**), MMP-9 (**B**), MMP-11 (**C**), MMP-13 (**D**), TIMP-1 (**E**), TIMP-2 (**F**) und TIMP-3 (**G**) in primären EC-Zell-Tumoren (Tu, n = 25), deren Lymphknotenmetastasen (LKM, n = 24) und entsprechenden ilealen Schleimhäuten (Muc, n = 25). Die mittels quantitativer real-time RT-PCR ermittelten mRNA-Mengen wurden nach Normalisierung mit 10^6 GAPDH mRNA-Kopien als relative Expression dargestellt. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney Rang Summen-Test errechnet. Boxen entsprechen dem Median bzw. der 25./75. Perzentile, Whiskers der 10./90. und gefüllte Kreise der 5./95. Perzentile. Die Anzahl der einbezogenen Proben variierte für MMP-13 (Tu/Muc n=22 bzw. LKM n=21).

Eine signifikant geminderte MMP-2-Expression zeigte sich im Vergleich zu Mukosa und Primaren in Lymphknotenmetastasen (Abbildung 3.4 A). Für MMP-9 konnte verglichen mit der Mukosa eine nicht signifikante Tendenz zu erhöhten Werten in der lymphatischen Metastase festgestellt werden (Abbildung 3.4 B). Gegenüber der Schleimhaut war MMP-11 signifikant im Primärtumor und tendenziell in den Lymphknotenmetastasen gesteigert (Abbildung 3.4 C). Bei den Inhibitoren der MMPs wurden sowohl TIMP-1 als auch TIMP-3 in Tumor und Lymphknotenmetastasen signifikant höher als in der normalen Mukosa exprimiert (Abbildung 3.4 E und G). Für MMP-13 (Abbildung 3.4 D) und TIMP-2 (Abbildung 3.4 F) konnten keine Expressionsunterschiede zwischen den Gewebearten nachgewiesen werden. Die Expressionsniveaus waren für MMP-2, TIMP-2 und TIMP-3 insgesamt sehr hoch, sehr niedrig waren sie bei MMP-13 und vor allem MMP-7 (Daten lagen im einstelligen Bereich und werden nicht gezeigt).

Die entsprechenden Daten für die vaskulären Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren werden in Abbildung 3.5 dargestellt. VEGF-A (Abbildung 3.5 A) zeigte ebenso wie VEGF-C (Abbildung 3.5 C) im Vergleich der relativen Expressionen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gewebegruppen, allerdings lagen die Werte für VEGF-A insgesamt auf einem sehr hohen Bereich. VEGF-B- (Abbildung 3.5 B) und VEGF-D-mRNA-Expressionsraten (Abbildung 3.5 D) waren in den Primärtumoren und in den Lymphknotenmetastasen im Vergleich zur Mukosa signifikant gesteigert. Die Expressionsprofile der Rezeptoren zeigten, ausgehend von der normalen Ileumschleimhaut, für VEGFR-1 (Abbildung 3.5 E) und VEGFR-2 (Abbildung 3.5 F) eine signifikante Expressionssteigerung in den Primaren. In den Lymphknotenfiliae galt die Signifikanz nur für VEGFR-1. VEGFR-2 zeigte hier nur eine Tendenz zur Steigerung. Keine eindeutigen Unterschiede konnten für VEGFR-3 (Abbildung 3.5 G) festgestellt werden. VEGF-C, VEGFR-3 und vor allem VEGFR-1 wurden auf relativ niedrigem Niveau exprimiert.
Die Expressionsraten in den Primaren und den entsprechenden Proben normaler Ileumschleimhaut korrelierten signifikant positiv miteinander. Eine Ausnahme bildeten VMAT-1, VEGF-D und VEGFR-1 bei denen keine Korrelation nachgewiesen werden konnte.

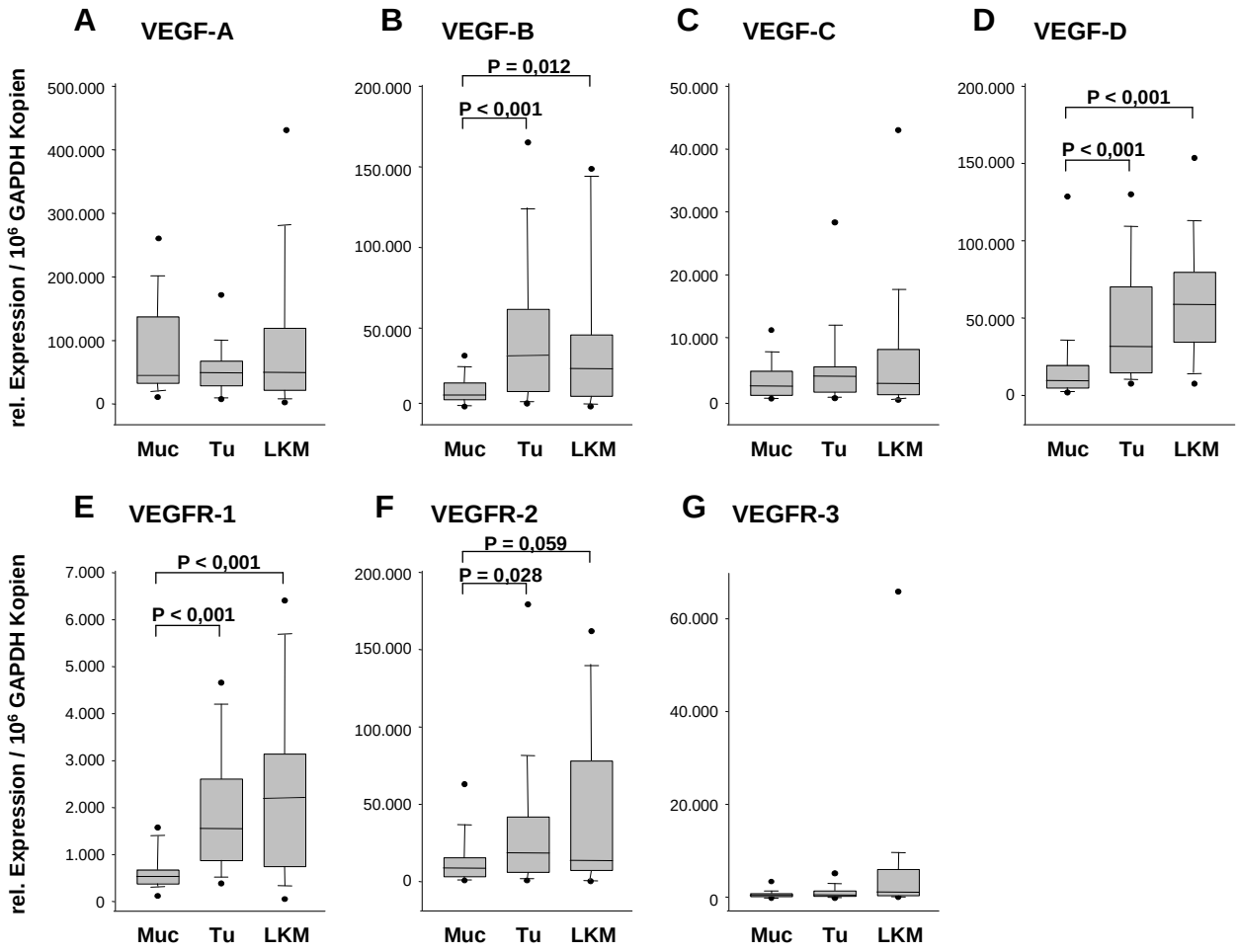


Abbildung 3.5: Expressionsniveau vaskulärer Wachstumsfaktoren (VEGF) und ihrer Rezeptoren (VEGFR). Dargestellt wird das Expressionsverhältnis von VEGF-A (**A**), VEGF-B (**B**), VEGF-C (**C**), VEGF-D (**D**), VEGFR-1 (**E**), VEGFR-2 (**F**) und VEGFR-3 (**G**) in primären Karzinoiden des Ileums (Tu, n = 25), deren Lymphknotenmetastasen (LKM, n = 24) und entsprechenden Mukosae (Muc, n = 25). Die mit qRT-PCR gemessenen mRNA-Mengen wurden mit 10^6 GAPDH mRNA-Kopien normalisiert und als relative Expression dargestellt. Die indizierten P-Werte wurden mittels Mann-Whitney Rang Summen-Test errechnet. Boxen entsprechen dem Median bzw. der 25./75. Perzentile, Whiskers der 10./90. und gefüllte Kreise der 5./95. Perzentile. Die Anzahl der einbezogenen Proben variierte bei VEGFR-1 (n=24 bei Muc).

3.4.2. Subgruppenanalyse der Tumore mit hepatischer Filialisierung

Angeschlossen wurde eine Subgruppenanalyse der Expressionsprofile bei Patienten mit hepatischer Fernmetastasierung (M1-Gruppe). Dabei wurde zusätzlich die relative Expression der Parameter im Gewebe der Lebermetastasen betrachtet, wenn auch die statistische Aussagekraft durch die geringe Gruppengröße eingeschränkt blieb. Einen Überblick über die untersuchten Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren für die M1-Subgruppe bietet Abbildung 3.6. Entsprechend der Daten in der Gesamtgruppe (Abbildung 3.4) zeigte sich im Vergleich zur Mukosa bei der MMP-2-Expression (Abbildung 3.6 A) insgesamt eine Tendenz zu niedrigeren Werten im neoplastischen Material. Diese Tendenz scheint sich mit zunehmender Entfernung zum Primar fortzusetzen und erreichte in den Leberfiliae Signifikanz. Bei den Parametern MMP-9,

MMP-13 und TIMP-2 (Abbildung 3.6 B, D und F) ließ sich auch hier kein statistisch aussagekräftiger Unterschied zwischen den verschiedenen Gewebegruppen finden. Die relative Expression war für MMP-11 und TIMP-3 (Abbildung 3.6 C und G) in den Korrelaten neoplastischen Ursprungs wie oben im Vergleich zur Mukosa gesteigert, für Primar und Lymphknotenmetastase sogar signifikant. TIMP-1 (Abbildung 3.6 E) wurde, verglichen mit der Schleimhaut, in Primärtumor, lymphatischen und hepatischen Metastasen signifikant stärker exprimiert. Auch dieses Ergebnis deckte sich mit der Analyse der Gesamtgruppe.

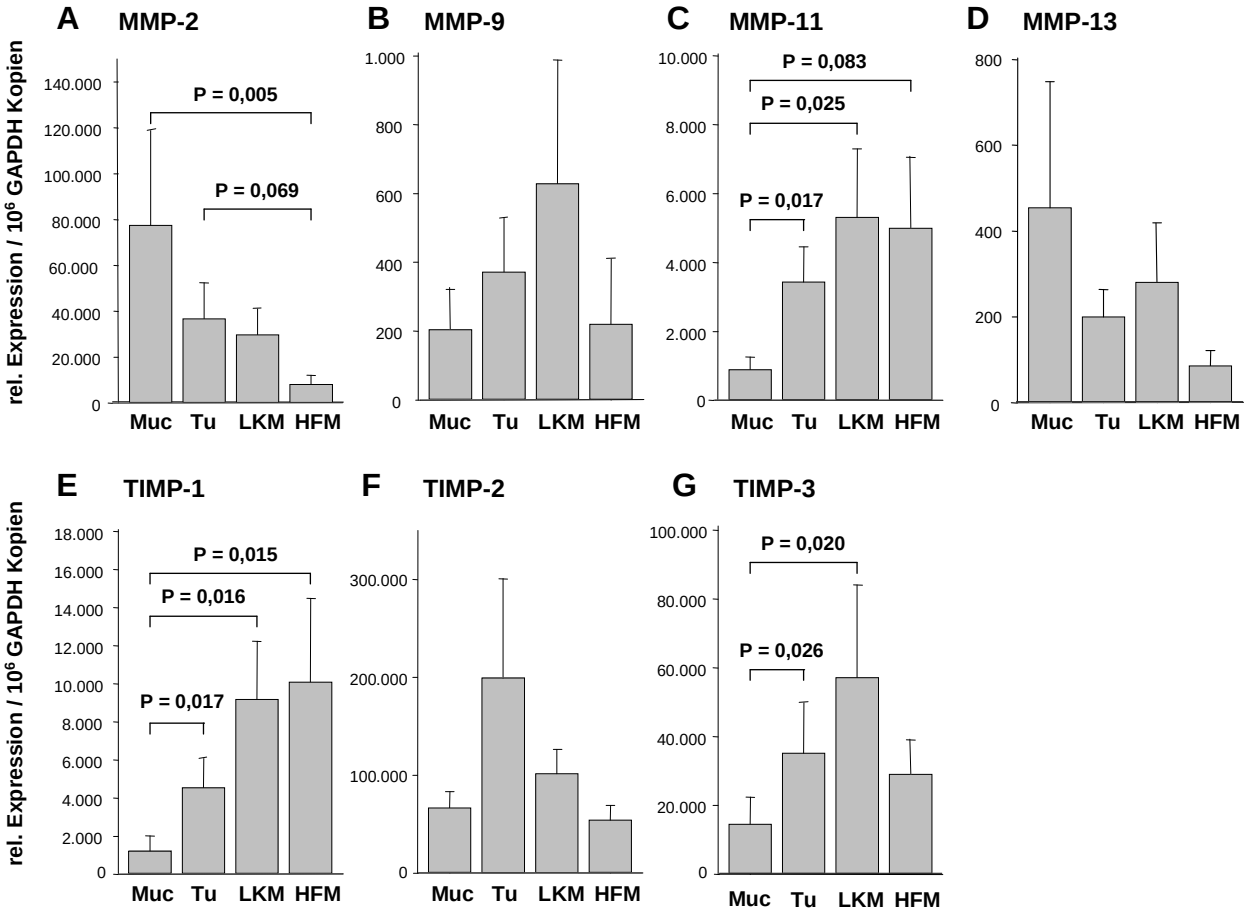


Abbildung 3.6: Expression der Matrixmetalloproteinasen (MMP) und ihrer Inhibitoren (TIMP) in der M1-Subgruppe. Die Grafik gibt einen Überblick über die Expression von MMP-2 (**A**), MMP-9 (**B**), MMP-11 (**C**), MMP-13 (**D**), TIMP-1 (**E**), TIMP-2 (**F**) und TIMP-3 (**G**) in primären, hepatisch metastasierten EC-Zell-Tumoren (Tu, n = 10), deren Lymphknotenmetastasen (LKM, n = 9) und hepatischen Fernmetastasen (HFM, n = 8), sowie entsprechenden ilealen Schleimhäuten (Muc, n = 10). Mittels quantitativer real-time RT-PCR ermittelten mRNA-Mengen wurden nach Normalisierung mit 10^6 GAPDH mRNA-Kopien als relative Expression dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney Rang Summen-Test errechnet. Die Anzahl der einbezogenen Proben variierte bei MMP-13 (Tu/Muc n=8, LKM n=7, HFM n=6).

Die entsprechende Subgruppenanalyse für die vaskulären Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren zeigt Abbildung 3.7. Vergleichbar mit den Ergebnissen in der Gesamtgruppe (Abbildung 3.5) konnten bei den Parametern VEGF-A, VEGF-C und VEGFR-3 (Abbildung 3.7 A, B und G) keine statistisch eindeutigen Expressionsunterschiede in den

Gewebegruppen festgestellt werden. Das gleiche Bild zeigte sich zusätzlich bei VEGF-B (Abbildung 3.7 B). Entsprechend der oben genannten Ergebnisse war die relative Expression von VEGF-D und VEGFR-1 (Abbildung 3.7 D und E) jeweils im Primar und in der Lymphknotenmetastase verglichen mit der Mukosa signifikant gesteigert, für VEGFR-2 (Abbildung 3.7 F) galt dies nur für die lymphatischen Filiae. Keiner der vaskulären Parameter war im Gewebe der Lebermetastasen statistisch relevant verändert. Die Expressionsmuster verhielten sich allerdings tendenziell eher wie bei den Lymphknotenfiliae, aber zumeist auf etwas niedrigerem Niveau.

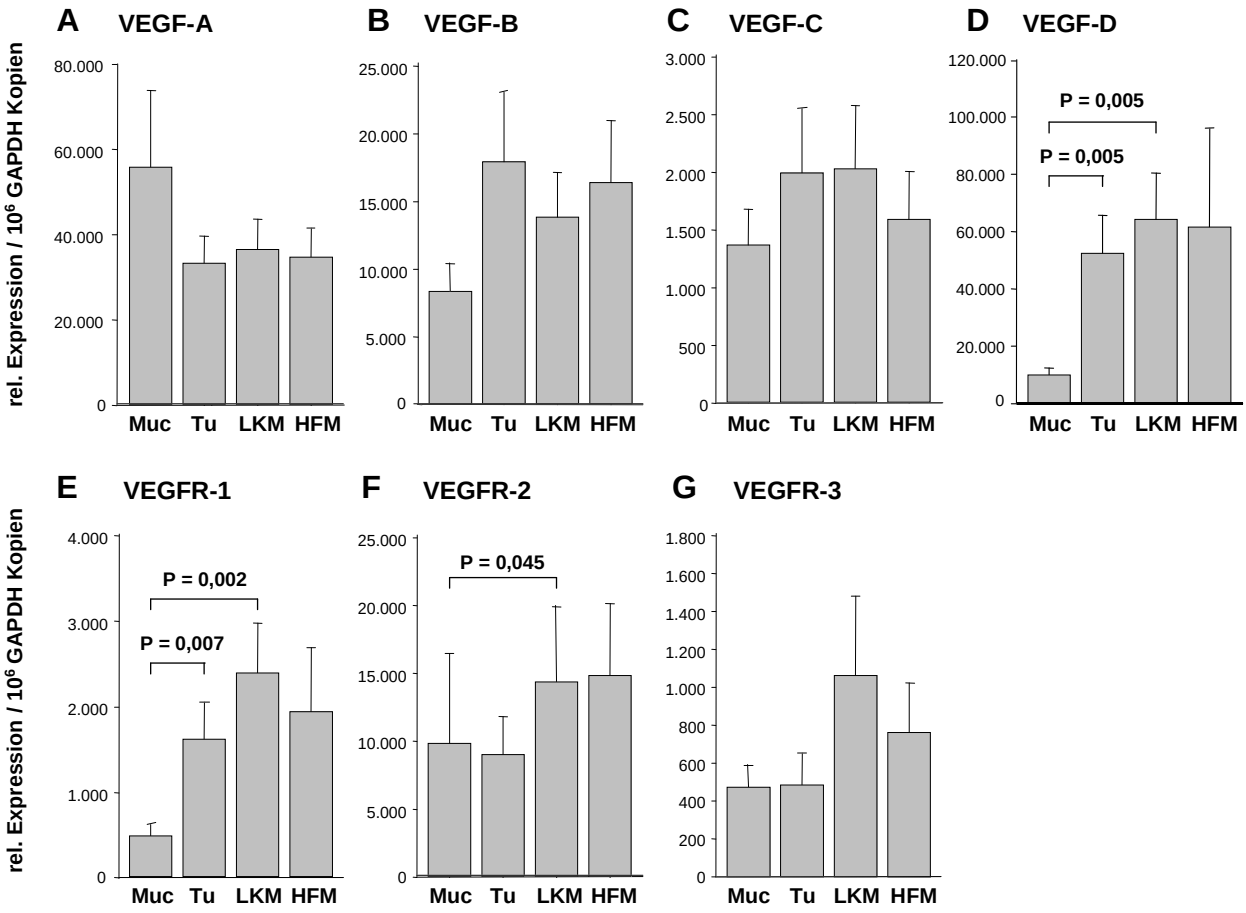


Abbildung 3.7: Expression vaskulärer Wachstumsfaktoren (VEGF) und Rezeptoren (VEGFR) in der M1-Patientensubgruppe. Dargestellt wird das Expressionsverhältnis von VEGF-A (**A**), VEGF-B (**B**), VEGF-C (**C**), VEGF-D (**D**), VEGFR-1 (**E**), VEGFR-2 (**F**) und VEGFR-3 (**G**) in primären, hepatisch filialisierten Karzinoiden des Ileums (Tu, n = 10), deren Lymphknotenmetastasen (LKM, n = 9) und Lebermetastasen (HFM, n = 8), sowie entsprechenden Mukosae (Muc, n = 10). Mittels qRT-PCR gemessene mRNA-Mengen wurden mit 10^6 GAPDH mRNA-Kopien normalisiert und als relative Expression dargestellt. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney Rang Summen-Test errechnet.

3.4.3. Korrelation der untersuchten Parameter

Um ein Muster in den Expressionsprofilen der Primare auch im Vergleich zur Mukosa zu identifizieren, wurden die einzelnen Parametergruppen miteinander korreliert (siehe Tabelle 3.3.)

Für die Expression von VMAT-1 in den Primärtumoren ergab sich eine positive Korrelation mit allen Faktoren außer MMP-11, VEGF-D und VEGFR-1.

Bei den Matrixmetalloproteinasen im Primar korrelierte MMP-2 positiv mit MMP-9 und negativ mit MMP-13, für MMP-11 ergab sich keinerlei Korrelation mit einer anderen Proteinase. Die Expressionsprofile der TIMP-Gruppe in den Primärtumoren waren untereinander und zu denen von MMP-2 und MMP-9 direkt proportional, sowie indirekt proportional zur MMP-13-Expression. MMP-11 zeigte nur eine positive Korrelation mit TIMP-1.

Die vaskulären Wachstumsfaktoren und entsprechenden Rezeptoren korrelierten in den primären Tumoren alle positiv miteinander. Eine Ausnahme bildete VEGF-D, dessen Expressionsprofil mit keinem anderen Parameter der Gruppe einen Zusammenhang zeigte.

	VMAT-1	MMP-2	MMP-9	MMP-11	MMP-13	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	VEGF-A	VEGF-B	VEGF-C	VEGF-D	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3
VMAT-1		+	+	0	-	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+
MMP-2	+		+	0	-	+	+	+	+	+	+	0	0	+	+
MMP-9	+	+		0	0	+	+	+	0	0	+	0	0	+	+
MMP-11	0	0	0		-	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MMP-13	-	-	0	-		-	-	-	-	-	-	0	0	-	-
TIMP-1	+	+	+	+	-		+	+	+	+	+	0	0	+	+
TIMP-2	+	+	+	0	-	+		+	+	+	-	0	0	+	+
TIMP-3	+	+	+	0	-	+	+		+	+	+	0	0	+	+
VEGF-A	+	+	0	0	-	+	+	+		+	+	0	+	+	+
VEGF-B	+	+	0	0	-	+	+	+	+		+	0	+	+	+
VEGF-C	+	+	+	0	-	+	-	+	+	+		0	+	+	+
VEGF-D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0	0
VEGFR-1	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	0		+	+
VEGFR-2	+	+	+	0	-	+	+	+	+	+	+	0	+		+
VEGFR-3	+	+	+	0	-	+	+	+	+	+	+	0	+	+	

Tabelle 3.3: Korrelation der Expressionsniveaus der einzelnen Parameter untereinander. Die Tabelle demonstriert die Korrelation der relativen Expression der untersuchten Parameter in Primärtumoren. (+) steht für direkte Proportionalität, (-) für indirekte und (0) für fehlende Korrelation. Die Daten wurden mittels Spearman-Korrelation analysiert.

Die Expressionsniveaus von MMP-2 und der TIMP-Gruppe im Primar korrelierten positiv mit fast allen VEGFs, außer mit VEGF-D. Die Werte für MMP-13 zeigten eine indirekte Proportionalität zu VEGF-A, -B und –C, diejenigen für MMP-9 eine direkte mit VEGF-C.

Die VEGF-Rezeptoren 2 und 3 wurden in den Primaren direkt proportional zu MMP-2, MMP-9 und allen TIMPs und indirekt proportional zu MMP13 exprimiert.
Zusammenfassend korrelierte der Großteil der untersuchten Parameter meist direkt miteinander. Einzig die Expression von MMP-13 verhielt sich generell invers zu den anderen. VEGFR-1 korrelierte nur mit anderen VEGF-Liganden und –Rezeptoren und MMP-13 nur mit positiv TIMP-1 und negativ mit MMP-11. Die Expression von VEGF-D hingegen zeigte keinerlei Assoziation zum Expressionsverhalten der übrigen Faktoren.

3.5. Korrelation der Expression mit klinisch-histopathologischen Daten

3.5.1. Subgruppenanalyse nach Metastasierungsstatus

Die Auswirkung einer Fernmetastasierung auf die Expression im Primärtumor wurde in einer weiteren Subgruppenanalyse betrachtet. Dazu wurden, wie in Abbildung 3.8 dargestellt, für alle untersuchten Parameter die Expressionsprofile der Primare von Patienten ohne Fernmetastasen denjenigen von Patienten mit nachgewiesener Lebermetastasierung gegenübergestellt. Für einen Großteil der Parameter zeigte sich eine deutlich verminderte relative Expression in fernmetastasierten Tumoren (M1) im Vergleich zu nur lokal metastasierten Tumoren (M0), signifikant war diese Senkung für den Marker VMAT-1 (Abbildung 3.8 O), für MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3 (Abbildung 3.8 A, B, E, Fund G), sowie für VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGFR-2 und VEGFR-3 (Abbildung 3.8 H, I, J, M und N). Nachgewiesen werden konnte die Expressionsreduktion bei fernmetastasierten Karzinoiden auch bei Integrin-β-1, -2 und –3 (Daten nicht gezeigt). Für MMP-11 zeigte sich zwischen den beiden Gruppen kein Unterschied (Abbildung 3.8 C) und VEGFR-1 (Abbildung 3.8 L) wurde in Tumoren der M0-Gruppe nur dezent mehr exprimiert. Ein Anstieg des Expressionsniveaus in Primaren der M1-Gruppe konnte nur für VEGF-D (Abbildung 3.8 K) und signifikant für MMP-13 (Abbildung 3.8 D) festgestellt werden.
Auch das Expressionsverhalten in den Lymphknotenmetastasen wurde hinsichtlich der Anwesenheit von Fernmetastasen untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde wie in den Primärtumoren ebenfalls eine grundsätzliche Tendenz zu einem Expressionsabfall bei Patienten mit Fernmetastasierung festgestellt, wenn auch nur MMP-9, VEGF-B und VMAT-1 in der Gruppe M1 signifikant reduziert waren. Nur unwesentliche Expressionsunterschiede zwischen lokaler und disseminierter Filialisierung zeigten sich bei MMP-11, VEGF-D und VEGFR-1 und eine eindeutige jedoch nicht-signifikante Steigerung fand sich nur für MMP-13.

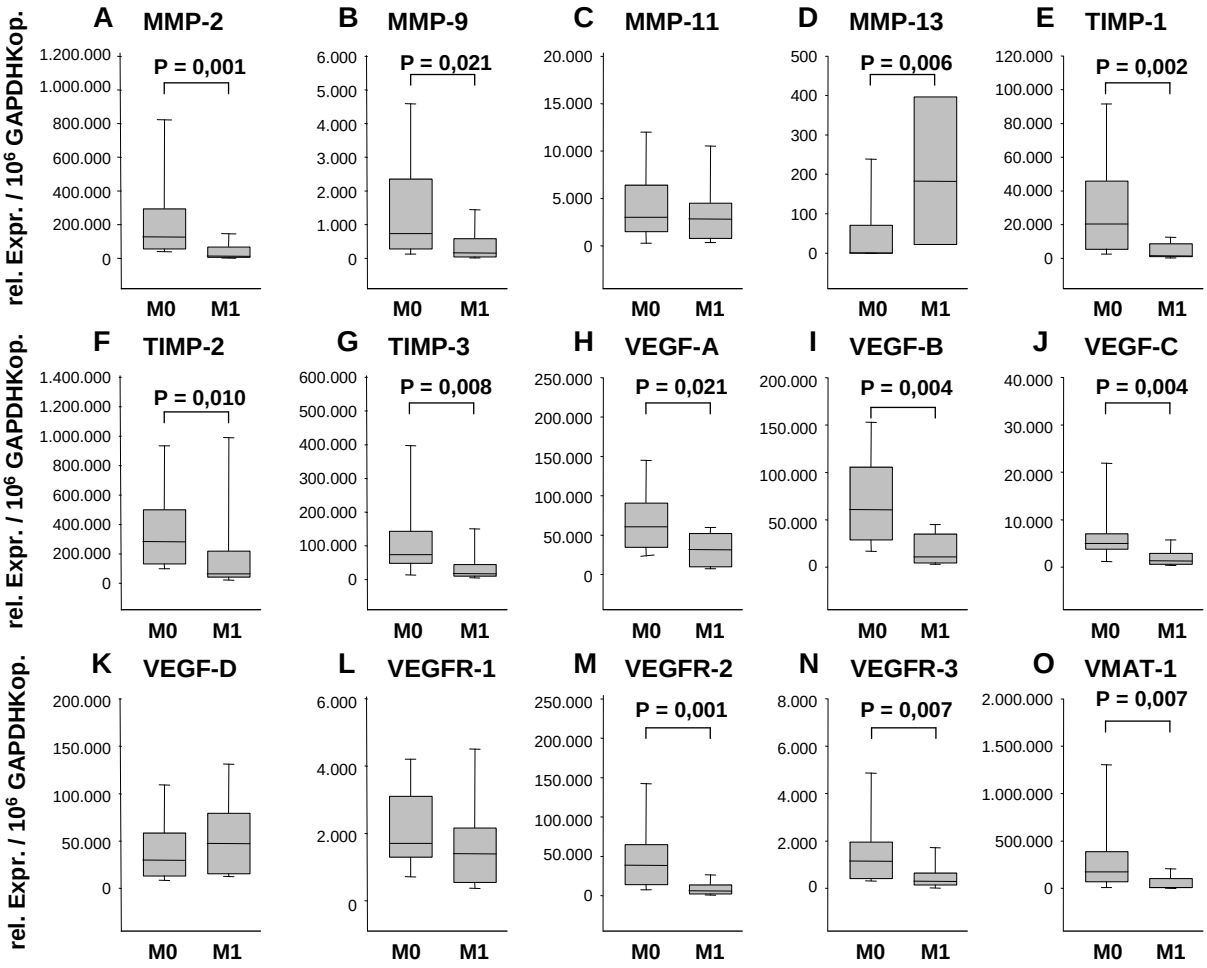


Abbildung 3.8: Vergleich der Expression in Primärtumoren der M0- und der M1-Patientengruppe. Verglichen werden für alle untersuchten Parameter die Expressionsprofile der Primare von Patienten ohne Fernmetastasierung (M0, n=15) mit denjenigen von Patienten mit nachgewiesener Leberfilialisierung (M1, n=10). Die als relative Expression dargestellten mRNA-Mengen wurden mit qRT-PCR gemessen und mit 10^6 GAPDH mRNA-Kopien normalisiert. Boxen entsprechen dem Median bzw. der 25./75. Perzentile, Whiskers der 5./95. Perzentile. Die indizierten P-Werte wurden mittels Mann-Whitney Rang Summen-Test errechnet. Die Anzahl der einbezogenen Proben variierte bei MMP-13 (M0 n=14, M1 n=8).

3.5.2. Subgruppenanalyse nach maximalem Tumordurchmesser

Bei der Betrachtung des Einflusses des maximalen Tumordurchmessers auf das Expressionsverhalten der primären Ileumkarzinoide wurden entsprechend der Empfehlung von Klöppel et al. [242] Subgruppen mit kleinen Tumoren (1) mit Diametern ≤ 10mm, mittelgroßen Tumoren (2) im Intervall ab 10mm bis eingeschlossen 20mm und großen Tumoren (3) > 20mm eingeteilt.

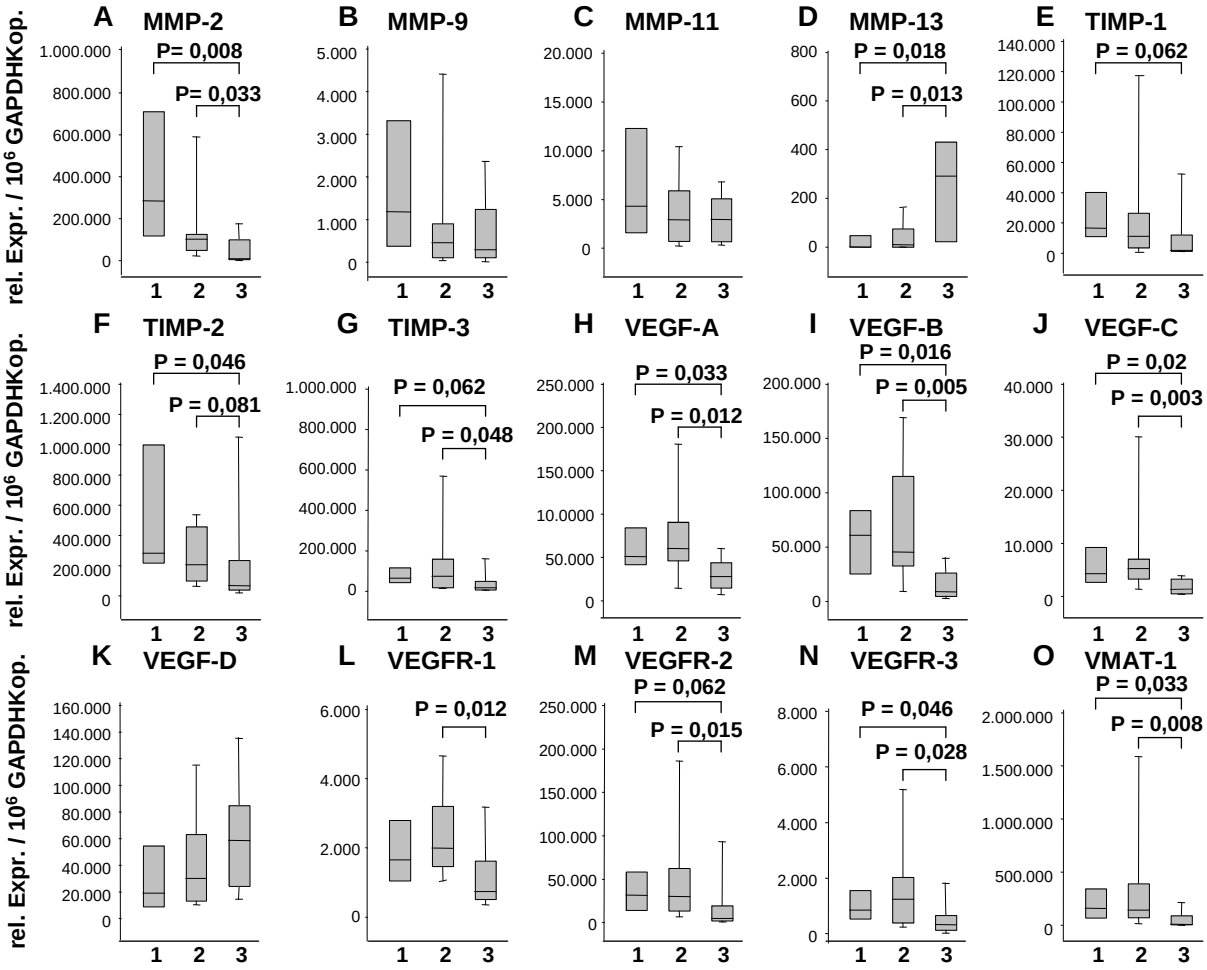


Abbildung 3.9: Subgruppenvergleich des Expressionsverhaltens bezüglich des maximalen Tumordurchmessers. Primärtumore mit einem maximalen Diameter ≤ 10mm **[1]** (n = 5), ab 10mm bis einschließlich 20mm **[2]** (n = 11) oder > 20mm **[3]** (n = 9) wurden hinsichtlich ihres Expressionsprofils für MMP-2 (**A**), MMP-9 (**B**), MMP-11 (**C**), MMP-13 (**D**), TIMP-1 (**E**), TIMP-2 (**F**), TIMP-3 (**G**), VEGF-A (**H**), VEGF-B (**I**), VEGF-C (**J**), VEGF-D (**K**), VEGFR-1 (**L**), VEGFR-2 (**M**), VEGFR-3 (**N**) und VMAT-1 (**O**) verglichen. Die mittels qRT-PCR gemessen mRNA-Werte wurden mit 10^6 GAPDH mRNA-Kopien normalisiert und als relative Expression dargestellt. Boxen entsprechen dem Median bzw. der 25./75. Perzentile, Whiskers der 5./95. Perzentile. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney Rang Summen-Test errechnet. Für MMP-13 variierte die Anzahl der einbezogenen Proben (10-20mm n=10, >20mm n=7).

Der Vergleich der Expressionsprofile in Tumoren unterschiedlicher maximaler Diameter für die untersuchten Parameter wird in Abbildung 3.9 dargestellt. Es zeigte sich eine beinahe durchgängige Tendenz zur Expressionsminderung in großen Tumoren. Signifikant war dieser Abfall des Expressionsniveaus im Vergleich zu sowohl kleinen als auch mittelgroßen Primaren für VMAT-1 (Abbildung 3.9 O), MMP-2 (Abbildung 3.9 A), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C und VEGFR-3 (Abbildung 3.9 H, I, J und N). Bei TIMP-3, VEGFR-1 und VEGFR-2 (Abbildung 3.9 G, L und M) war die Reduktion der relativen Expression in Primärtumoren > 20mm nur zu Tumoren mittlerer Größe signifikant und bei TIMP-2 (Abbildung 3.9 F) nur zu Tumoren ≤ 10mm. Ein Expressionsanstieg mit wachsendem Diameter konnte im Gegensatz zu den übrigen Parametern für VEGF-D (Abbildung 3.9 K) registriert werden und für MMP-13 (Abbildung 3.9 D) sogar eine

signifikante Steigerung des Expressionsniveaus in Tumoren größer als 20mm im Vergleich zu kleinen und auch mittleren Tumoren.
Kein Expressionsunterschied zwischen kleinen und mittelgroßen Tumoren war statistisch ausschlaggebend. Fanden sich Signifikanzen zwischen den Expressionsprofilen kleiner versus großer und/oder mittlerer versus großer Tumore, so galt dies auch für die Gesamtgruppe der Tumore ≤ 20mm im Vergleich zur Gruppe der Tumore > 20mm (Daten nicht graphisch aufgearbeitet).

3.5.3. Subgruppenanalyse nach T-Stadium

Um den Einfluss des T-Stadiums auf die Expression in den primären Karzinoiden zu evaluieren, wurden die Expressionsprofile der in T1, T2, T3 oder T4 eingeteilten Tumore verglichen (Daten nicht graphisch dargestellt). Generell zeigte sich für den Grossteil der untersuchten Parameter mit steigendem T-Stadium eine meist sehr mäßig fallende Tendenz der Expressionsniveaus. Signifikant war diese Expressionssenkung für die Faktoren MMP-2, VEGF-B, VEGF-C und VEGFR-2 in Primaren mit T4-Stadium gegenüber solchen mit T1-Stadium, zusätzlich für MMP-2 im Vergleich des T4-Stadiums mit dem T3-Stadium. Im Kontrast zu den übrigen Parametern erwies sich bei MMP-13 und VEGF-D eine Tendenz zu ansteigenden Expressionswerten mit progredientem T-Stadium. Karzinoide im Stadium T4 exprimierten signifikant mehr VEGF-D als Tumore im Stadium T1 oder T2 und auch für MMP-13 zeigte der Vergleich der Stadien T1 und T4 nahezu signifikante Unterschiede (P = 0,057).
Subgruppenuntersuchungen bei denen T-Stadien in verschiedene Gruppen zusammengefasst wurden, ergaben keinen zusätzlichen Hinweis auf einen Zusammenhang der Expressionsmuster und der T-Stadien.

3.5.4. Analysen unter weiteren klinisch-pathologischen Aspekten

Für die folgenden Subgruppenanalysen wurden die Daten ebenfalls nicht graphisch aufbereitet.
Die Analyse der Expressionsprofile der Primärtumore hinsichtlich des Tumorgrades ergab keinerlei statistische Relevanz für einen der untersuchten Parameter. Auch eine direkte Korrelation mit dem KI-67-Index ergab keinen statistischen Zusammenhang mit der Expression. Auch eine Unterscheidung multipler oder singulärer Primarverteilung erbrachte keine signifikante Verknüpfung mit der Expression.
Ein erhöhter HIES- Spiegel im 24h-Urin konnte in keinen Zusammenhang mit den Expressionsdaten der Primärtumore oder der hepatischen Metastasen gebracht werden.

Allerdings korrelierte die Expression von MMP-2, TIMP-1 und -2 in den Lymphknotenmetastasen signifikant negativ mit dem HIES-Spiegel.

Das Auftreten einer Diarrhö korrelierte negativ mit der TIMP-1-Expression im Primärtumor und positiv mit der VEGF-C- und VEGF-D-Expression in der Lebermetastase. Flush-Symptomatik hatte einen signifikanten Zusammenhang mit einer erniedrigten Expression von VMAT-1, MMP-2, VEGF-A, -B und VEGFR-2, sowie einer gesteigerten Expression von MMP-13 im Primärtumor, einer Expressionsreduktion von MMP-9 in den Lymphknotenmetastasen und von VEGF-A und VEGF-B in den Leberfiliae. B-Symptomatik korrelierte negativ mit dem Expressionsniveau von VMAT-1, MMP-9, TIMP-1 und VEGFR-3 im Primar, sowie von VMAT-1 in den lymphatischen Filiae.

Die Expression im Primar war für MMP-9, MMP-11, TIMP-1 und VEGF-D signifikant bei männlichen Patienten gesteigert, für VEGFR-1 bei weiblichen. Eine Expressionssteigerung in den Leberfiliae fand sich für MMP-2, MMP-11 und TIMP-2 bei der männlichen Gruppe. Es fand sich keine altersabhängige Korrelation der Expressionsdaten.

3.6. Mikrovaskuläre Dichte

3.6.1. Immunhistochemie, über CD-31 zur MVD

Zur Evaluation der mikrovaskulären Dichte (MVD) wurde der Gefäßmarker CD-31 in den Primärtumoren immunhistochemisch angefärbt (siehe Abbildung 2.5 S.52 und Abbildung 3.10), die Gefäße nach Weidner im Mikroskop gezählt [527] und zu 1mm² Gewebe normalisiert (Methodik unter 2.8.6, S.53).

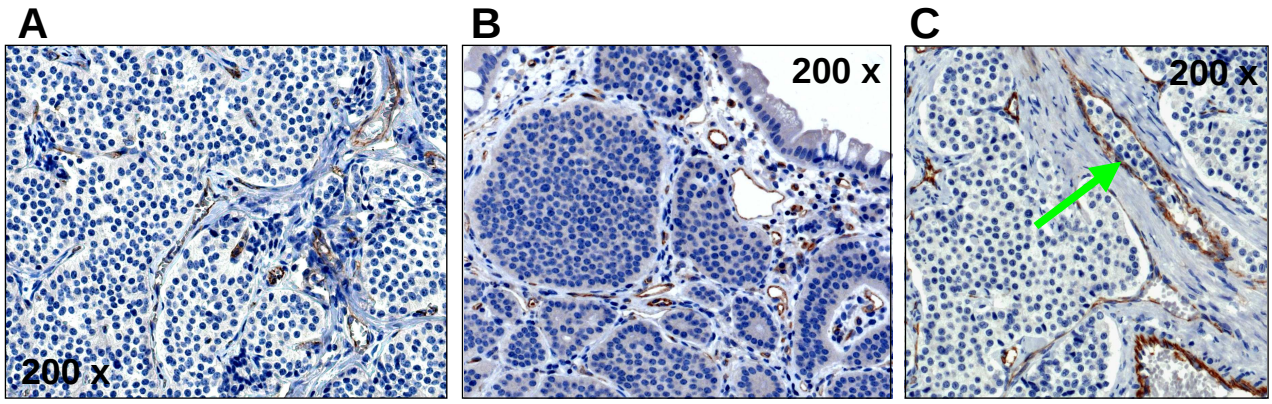


Abbildung 3.10: CD-31-positive Gefäße in primären Ileumkarzinoiden. Bild **A** zeigt einen Ausschnitt aus dem Tumorzentrum eines Primars. Bild **B** bildet ein Ileumkarzinoid im luminalen Tumorrandgebiet ab. Auf Bild **C** ist ein größeres tumorzentral gelegenes Gefäß (grüner Pfeil) mit Tumorzellen im Lumen zu sehen. Die Gewebeschnitte wurden mit einem CD-31-spezifischen Antikörper immunhistochemisch gefärbt. CD-31-positive Endothelstrukturen sind braun und der Vergrößerungsfaktor war 200-fach.

Die zunächst vorgenommene Unterscheidung in MVD des Tumorrandbereichs (Abbildung 3.10 A) und MVD des Tumorzentrums (Abbildung 3.10 B) erwies sich als statistisch nicht signifikant (Abbildung 3.11 Teil A) und wurde in der folgenden Auswertung vernachlässigt. Da die lymphatische vaskuläre Dichte (LVD) im niedrigen zweistelligen Bereich pro 1mm² lag (siehe 3.7), wurde aufgrund mangelnder statistischer Relevanz auf eine Differenzierung zwischen CD-31-positiven-LYVE-1-positiven Lymphgefäße und CD-31-positiven-LYVE-1-negativen Blutgefäßen bei der Auswertung der MVD verzichtet.

3.6.2. Klinisch-histopathologische Subgruppenanalysen der MVD

Die Analyse eines Zusammenhangs zwischen klinischen Daten und der Gefäßdichte in den Primärtumoren ergab keine statistisch signifikante Verbindung der MVD mit Symptomatik, Geschlecht, Alter oder HIES-Spiegel (Daten nicht graphisch dargestellt).

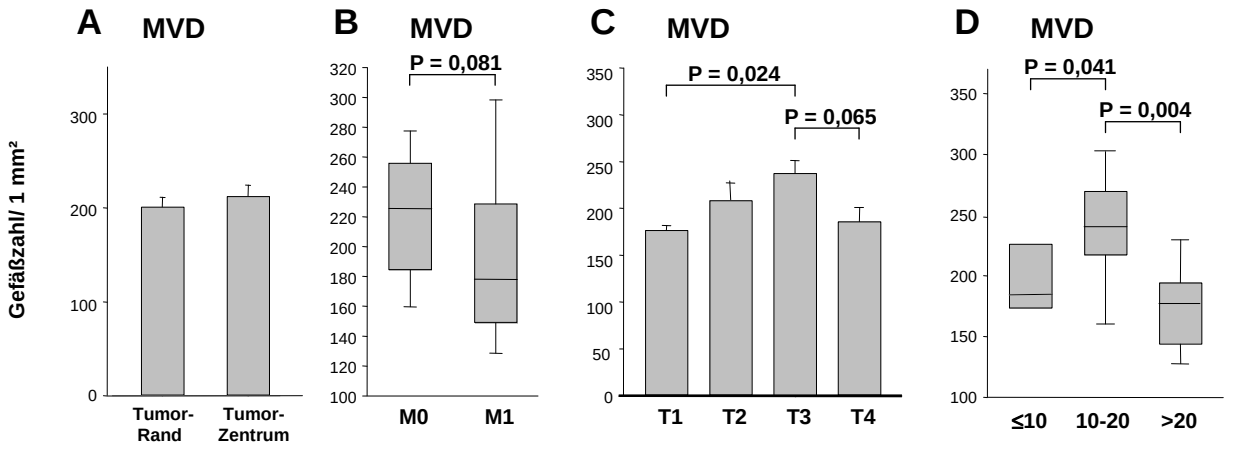


Abbildung 3.11: Korrelation histopathologischer Daten mit MVD. Teil A: Gegenübergestellt werden die mikrovaskulären Dichten (MVD) des Tumorzentrums und des Tumorrandbereiches. **Teil B:** Verglichen werden Tumore ohne (M0, n=15) und Tumore mit hepatischer Metastasierung (M1, n=10) anhand der Gefäßdichte. **Teil C:** Dargestellt sind die MVD-Mittelwerte der Stadien T1 (n = 3), T2 (n = 10), T3 (n = 6) und T4 (n = 6). **Teil D:** Nebeneinander gestellt werden die Gefäßdichteprofile von Tumoren mit maximalen Diametern ≤ 10mm (n = 5), zwischen 10 und 20mm (n = 11), sowie > 20mm (n = 9). Die angegebenen Werte in Teil A und C sind Mittelwerte der Gefäßzahl pro 1mm² ± SEM. Boxen in Teil B und D entsprechen dem Median bzw. der 25./75. Perzentile, Whiskers der 5./95. Perzentile. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney Rang Summen-Test erfasst.

Die Korrelation histopathologischer Daten mit der MVD (Abbildung 3.11) zeigte eine Tendenz zur geringeren Vaskularisierung bei Primärtumoren mit hepatischer Filialisierung (Abbildung 3.11 Teil B). Die Gefäßdichte der Karzinoide stieg zunächst mit höherem T-Stadium (Abbildung 3.11 Teil C), dieser Unterschied war zwischen T1 und T3 signifikant. Tumore mit einem T4-Stadium wiesen jedoch eine relativ geringere MVD auf. Primare mittlerer Größe zwischen 10 und 20mm waren signifikant stärker vaskularisiert als sowohl kleine, wie auch große Tumore (Abbildung 3.11 Teil D). Die

Untersuchung der MVD im Hinblick ihrer möglichen Wechselwirkung mit der Proliferation, dem Grading und singulärer bzw. multipler Tumorverteilung erbrachte keinen statistischen Zusammenhang (Daten nicht gezeigt).

3.6.3. Korrelation der MVD mit Expressionsdaten

Zur genaueren Betrachtung der Zusammenhänge zwischen der mikrovaskulären Dichte im Primärtumor und der Expressionsprofile der Tumoren, wurden diese Daten miteinander korreliert (Abbildung 3.12).

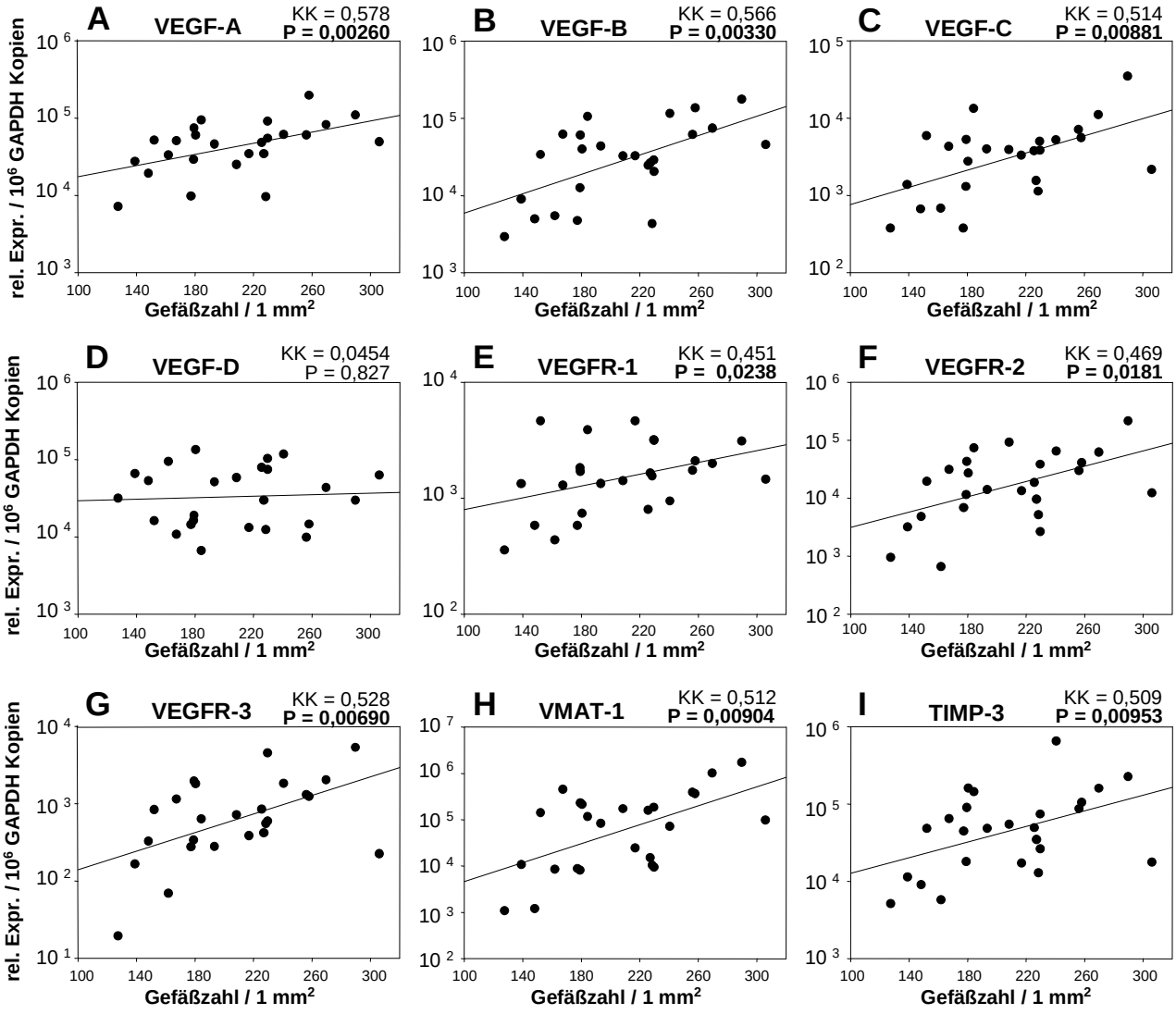


Abbildung 3.12: Korrelation der MVD mit der Expression von VEGF-Liganden, VEGF-Rezeptoren, VMAT-1 und TIMP-3 in primären Ileumkarzinoiden. Dargestellt ist die Dichte CD-31-postiver Gefäße in Bezug zur relativen Expression von VEGF-A (**A**), VEGF-B (**B**), VEGF-C (**C**), VEGF-D (**D**), VEGFR-1 (**E**), VEGFR-2 (**F**), VEGFR-3 (**G**), VMAT-1 (**H**) und TIMP-3 (**I**) in neuroendokrinen Primärtumoren des Ileums. Mittels qRT-PCR gemessene mRNA-Werte wurden mit 10^6 GAPDH mRNA-Kopien normalisiert und als relative Expression logarithmisch dargestellt. Die MVD ist die Gefäßzahl pro 1 mm² Tumor. P-Werte und Korrelationskoeffizienten (KK) wurden mittels Spearman Korrelation ermittelt.

Die relativen Expressionswerte nahezu aller untersuchten vaskulären Faktoren und ihre Rezeptoren wiesen eine signifikante positive Korrelation mit der mikrovaskulären Dichte in den primären Ileumkarzinoiden auf (Abbildung 3.12 A-C und F-G). Die einzige Ausnahme bildete hierbei VEGF-D (Abbildung 3.12 D), dessen Expression keine statistische Verknüpfung zur MVD zeigte.

Auch die Expression des EC-Zell-Markers VMAT-1 (Abbildung 3.12 H) korrelierte in den Primärtumoren signifikant positiv mit der MVD. Die Gefäßdichte besaß jedoch, abgesehen von der positiven Korrelation mit der TIMP-3-Expression (Abbildung 3.12 I), keinen Zusammenhang mit den Matrixmetalloproteinasen und ihrer Inhibitoren.

3.7. Lymphgefäßdichte

3.7.1. Immunhistochemie, über LYVE-1 zur ITL und PTL

Zur Untersuchung der lymphatischen vaskulären Dichte (LVD) in primären Ileumkarzinoiden wurde der spezifische Marker für Lymphendothel LYVE-1 immunhistochemisch gefärbt (siehe Abbildung 2.4 S.51 und Abbildung 3.13).

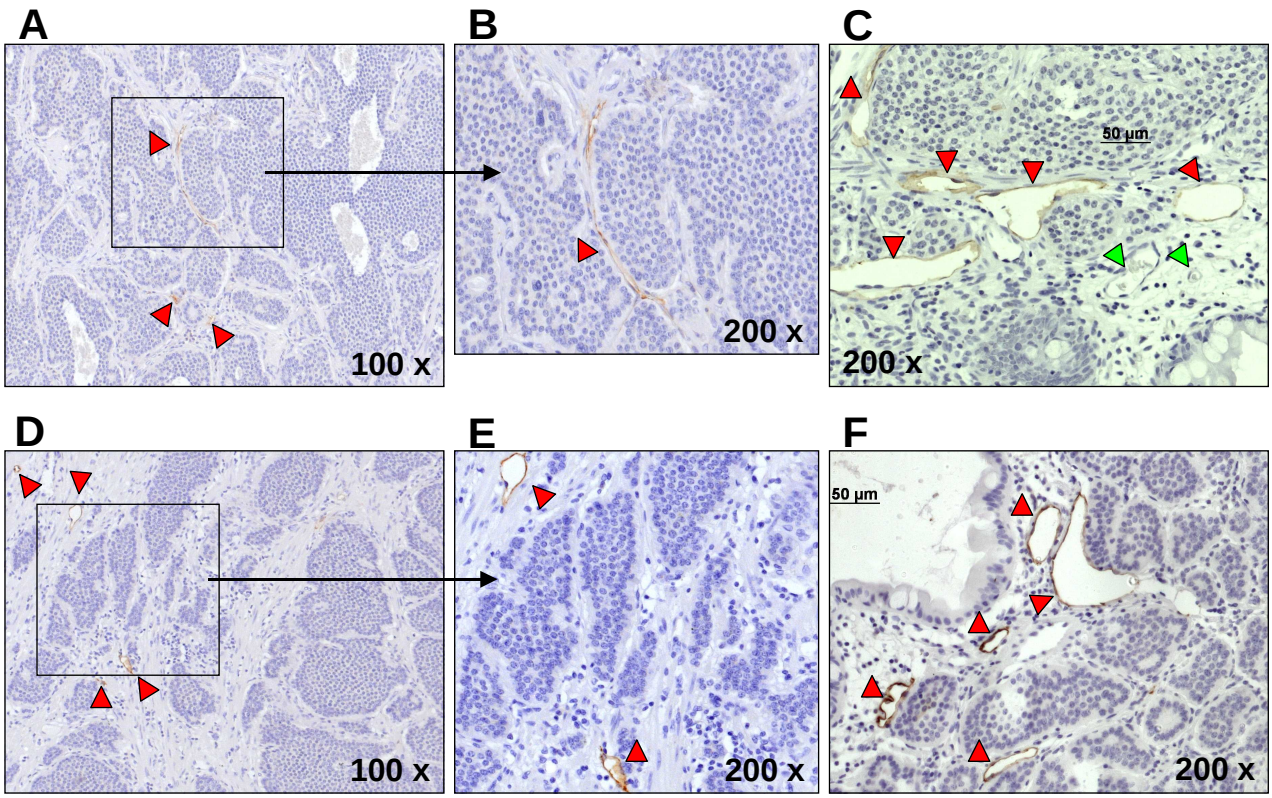


Abbildung 3.13: LYVE-1-positive Lymphgefäße in primären Ileumkarzinoiden. Bild **A** zeigt einen Ausschnitt aus dem Tumorzentrum eines Primars und die Detailaufnahme **B** aus Bild A ein intratumorales Lymphgefäß. In Bild **D** wurde ein Ileumkarzinoid im invasiven Tumorrandgebiet und in Bild **E** eine Detailaufnahme aus Bild D mit zwei peritumoralen Lymphgefäßen abgebildet. Bild **C** und Bild **F** demonstrieren luminale Randbereiche von Karzinoidprimaren mit mehreren peritumoralen Lymphgefäßen, sowie LYVE-1-negativen Blutkapillaren (grüne Pfeile). Die abgebildeten Gewebeschnitte wurden mit einem LYVE-1-spezifischen Antikörper immunhistochemisch gefärbt. LYVE-1-positive Endothelstrukturen sind braun und wurden mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Vergrößerungsfaktoren wurden indiziert.

Die Lymphgefäße wurden entsprechend der CD-31-positiven Gefäße nach Weidner ausgezählt [527] und zu 1mm² Gewebe normalisiert (Methodik unter 2.8.6, S.53). Die Unterscheidung in eine intratumorale Lymphgefäßdichte (ITL) des Tumorzentrums (Abbildung 3.13 A und B) und eine peritumorale Lymphgefäßdichte (PTL) des gesamten Tumorrandbereichs (Abbildung 3.13 C-F) erwies sich als signifikant (siehe Abbildung 3.14 A) und wurde in der folgenden Evaluation berücksichtigt. Die MVD war gegenüber der Lymphgefäßdichte stark und signifikant erhöht (Daten nicht graphisch aufgearbeitet).

3.7.2. klinisch-histopathologische Parameter und die Lymphgefäßdichte

Bei Betrachtung der Wechselwirkung klinischer Parameter mit der lymphatischen Gefäßdichte, fand sich abgesehen von einer positiven Korrelation der ITL mit dem Auftreten von Flush-Anfällen kein statistischer Zusammenhang zur PTL, ITL oder gesamten LVD (Daten nicht gezeigt).

Subgruppenanalysen nach histopathologischen Gesichtspunkten ergaben für die gesamt LVD keine statistisch relevanten Wechselbeziehungen, abgesehen von einer signifikanten Minderung in multipel verteilten Tumoren im Vergleich zu singulären Primaren (Daten nicht graphisch aufgearbeitet).

Bei Berücksichtigung der Lage der Lymphgefäße im Tumor konnte auch bei der PTL kein Zusammenhang mit den histopathologischen Parametern, insbesondere mit dem Vorhandensein von Fernmetastasen (Abbildung 3.14 E), dem T-Status (Abbildung 3.14 F) oder dem maximalen Tumordurchmesser (Abbildung 3.14 G) gefunden werden. Wohingegen die ITL in Primaren bei vorhandener Fernmetastasierung signifikant anstieg (Abbildung 3.14 B). Zudem zeigte sich eine Tendenz zur höheren intratumoralen Lymphgefäßdichte bei Tumoren mit höherem T-Status (Abbildung 3.14 C), signifikante Werte erreichte dies beim Vergleich des T1-Status mit T3 und T4. Eine direkte Proportionalität zeigte sich auch mit dem Tumordurchmesser (Abbildung 3.14 D), die ITL-Werte waren in kleinen Tumoren ≤ 10mm signifikant niedriger als in mittelgroßen Primaren und als in Tumoren > 20mm. Der Unterschied der ITL zwischen mittelgroßen und großen Primärtumoren erreichte allerdings keine Signifikanz.

Untersuchungen möglicher Wechselwirkungen der Proliferation, des Gradings oder singulärer bzw. multipler Tumorverteilung mit der intratumoralen oder peritumoralen Lymphgefäßdichte erbrachten keinen statistischen Zusammenhang (Daten nicht gezeigt).

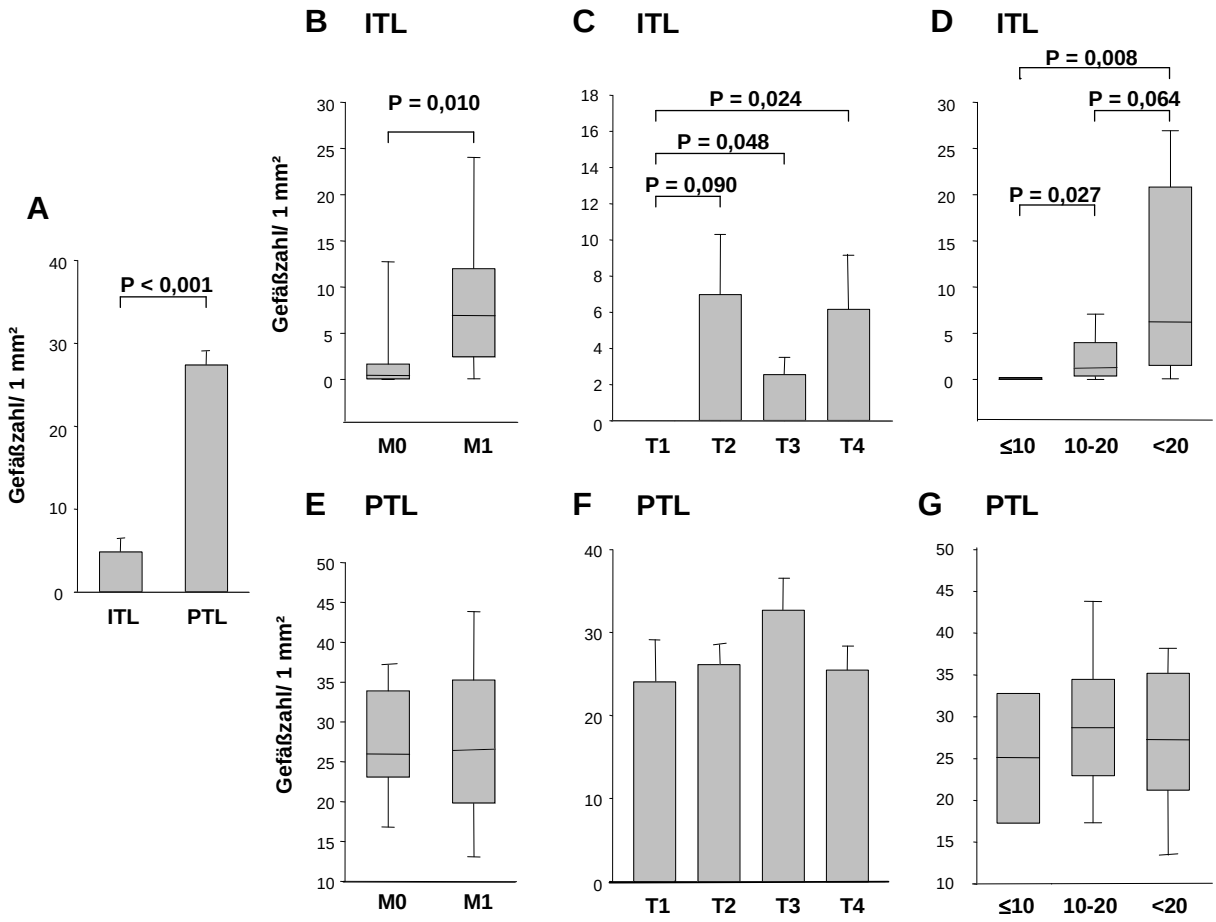


Abbildung 3.14: Vergleich der ITL und PTL und Korrelation mit histopathologischer Daten. Teil A: Gegenübergestellt werden die lymphatischen mikrovaskulären Dichten des Tumorzentrums (ITL) und des Tumorrandbereiches (PTL) (n=25). **Teil B und E:** Verglichen werden Tumore ohne (M0, n=15) und mit hepatischer Metastasierung (M1, n=10) anhand der ITL bzw. PTL. **Teil C und F:** Dargestellt sind die Mittelwerte der ITL bzw. PTL in den Stadien T1 (n = 3), T2 (n = 10), T3 (n = 6) und T4 (n = 6). **Teil D und G:** Nebeneinander gestellt werden die ITL bzw. PTL von Tumoren mit maximalen Diametern ≤ 10mm (n = 5), zwischen 10mm und einschließlich 20mm (n = 11) und > 20mm (n = 9). Die angegebenen Werte unter A, C und F sind Mittelwerte der Gefäßzahl pro 1mm² ± SEM. Boxen in Teil B, D, E und G entsprechen dem Median bzw. der 25./75. Perzentile, Whiskers der 5./95. Perzentile. P-Werte wurden mittels Mann-Whitney Rang Summen-Test errechnet.

3.7.3. Korrelation der Lymphgefäßdichte mit Expressionsdaten

Zur Analyse von Wechselbeziehungen zwischen der Lymphgefäßdichte in primären Ileumkarzinoiden und der Expression, der in dieser Arbeit untersuchten Parameter, wurden diese Daten miteinander korreliert.

Dabei konnte bei Betrachtung der gesamttumoralen LVD-Werte kein statistischer Zusammenhang mit VEGF-Liganden oder -Rezeptoren gefunden werden. Insbesondere galt dies für die im Allgemeinen lymphangiogenen VEGF-C, VEGF-D und VEGFR-3. Ebenso ergab sich keine signifikante Verbindung zwischen LVD und den Matrixmetalloproteinasen und ihren Inhibitoren. Einzig MMP-11 korrelierte signifikant negativ mit der LVD.

Darauf wurden Subgruppenanalysen mit der Unterscheidung intratumoraler und peritumoraler Lymphgefäße angeschlossen.

3.7.3.1. Intratumorale Lymphgefäßdichte und die VEGF-Familie

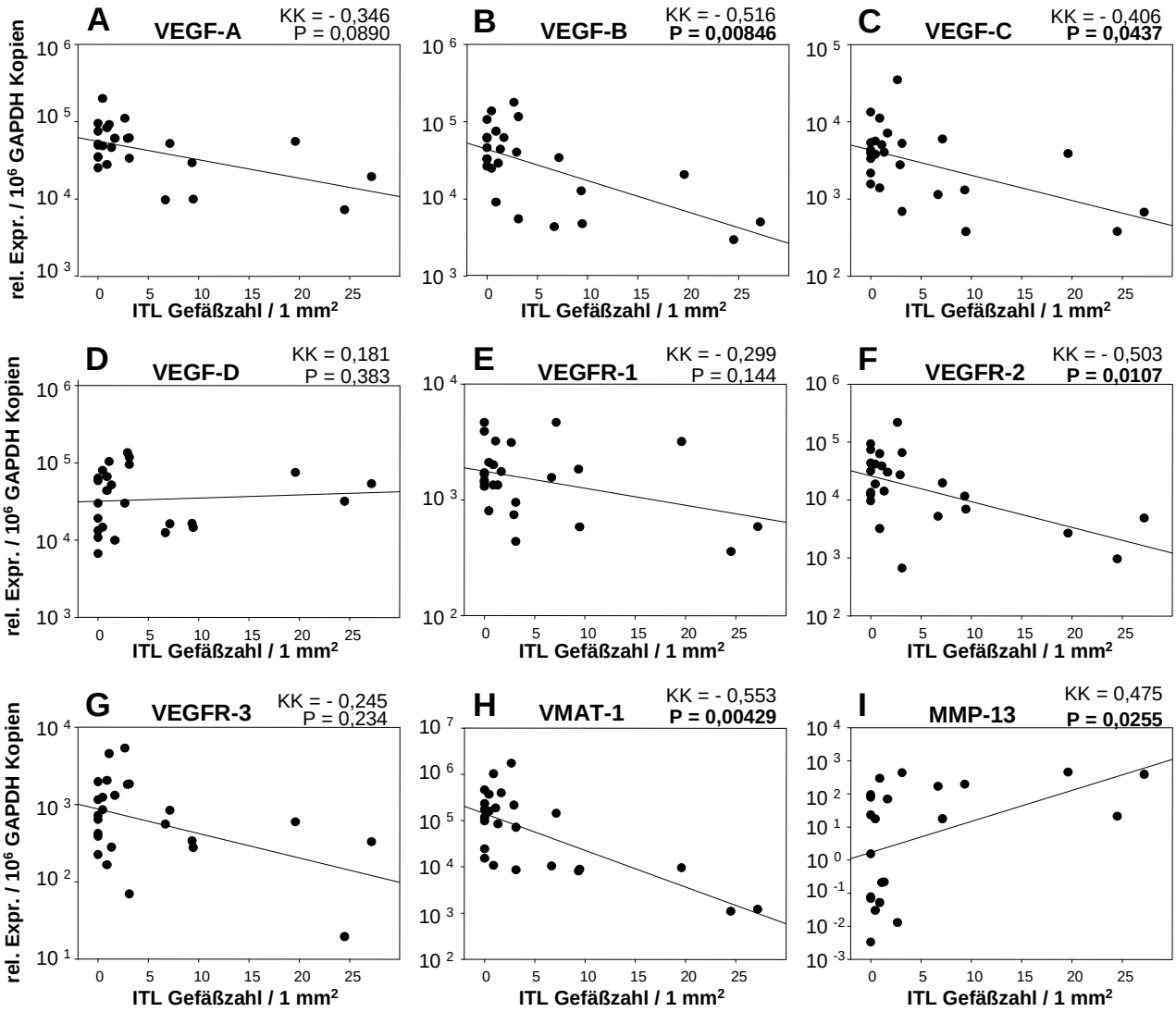


Abbildung 3.15: Korrelation der ITL mit der Expression von VEGF-Liganden, VEGF-Rezeptoren, VMAT-1 und MMP-13 in Karzinoidprimaren. Untersucht wurde die Wechselbeziehung zwischen der relativen Expression von VEGF-A (**A**), VEGF-B (**B**), VEGF-C (**C**), VEGF-D (**D**), VEGFR-1 (**E**), VEGFR-2 (**F**), VEGFR-3 (**G**), VMAT-1 (**H**) und MMP-13 (**I**) und der intratumoralen Dichte LYVE-1-postiver Gefäße in primären Ileumkarzinoiden. Mittels qRT-PCR gemessene mRNA-Werte wurden mit 10^6 GAPDH mRNA-Kopien normalisiert und als relative Expression logarithmisch dargestellt. Die ITL ist die Anzahl LYVE-1-positiver Gefäße im Tumorzentrum pro 1 mm². P-Werte und Korrelationskoeffizienten (KK) wurden mittels Spearman Korrelation ermittelt.

Die insgesamt sehr geringe Lymphgefäßdichte des Tumorzentrums wies beinahe durchgängig negative Korrelationskoeffizienten mit den vaskulären Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren auf (Abbildung 3.15). Eine Ausnahme bildete VEGF-D (Abbildung 3.15 D) dessen Koeffizient zumindest im niedrigen positiven Wertebereich lag. Signifikant korrelierte die ITL allerdings nur negativ mit der relativen Expression von

VEGF-B, VEGF-C und VEGFR-2 (Abbildung 3.15 B, C und F), sowie des EC-Zellmarkers VMAT-1 (Abbildung 3.15 H) und positiv mit MMP-13-Expressionswerten (Abbildung 3.15 I). Die restlichen Vertreter der Metalloproteinasen und TIMPs zeigten ebenfalls keinen statistischen Zusammenhang mit der ITL (Daten nicht gezeigt).

3.7.3.2. Peritumorale Lymphgefäßdichte und Expressionsdaten

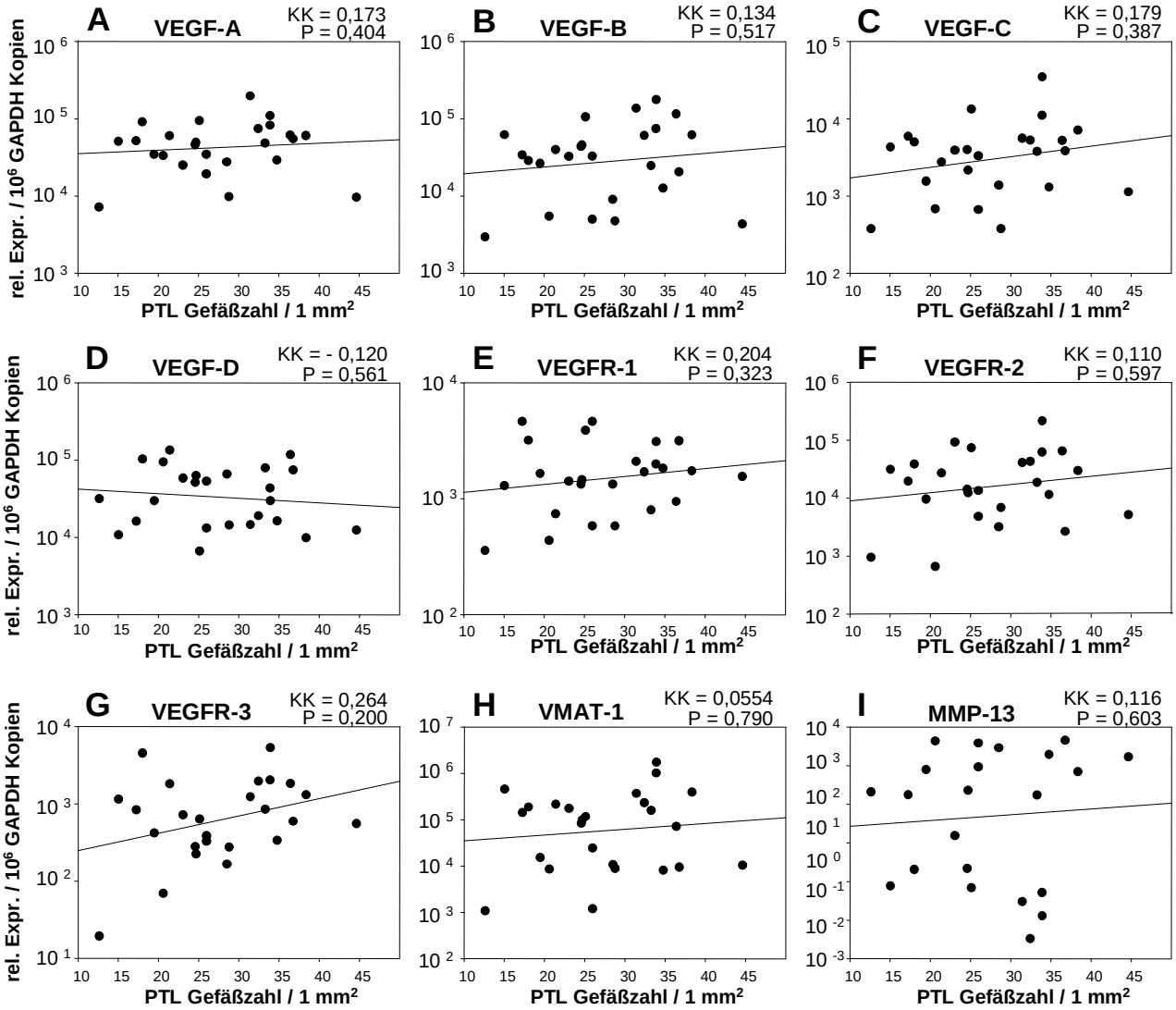


Abbildung 3.16: Korrelation der PTL mit der Expression von VEGF-Faktoren, VEGF-Rezeptoren, VMAT-1 und MMP-13 in primären Ileumkarzinoiden. Untersucht wurde die Wechselbeziehung zwischen der relativen Expression von VEGF-A (**A**), VEGF-B (**B**), VEGF-C (**C**), VEGF-D (**D**), VEGFR-1 (**E**), VEGFR-2 (**F**), VEGFR-3 (**G**), VMAT-1 (**H**) und MMP-13 (**I**) und der peritumoralen Dichte LYVE-1-postiver Gefäße endokriner Primare des Ileums. Mittels qRT-PCR gemessene mRNA-Werte wurden mit 10^6 GAPDH mRNA-Kopien normalisiert und als relative Expression logarithmisch dargestellt. Die PTL ist die Anzahl LYVE-1-positiver Gefäße in der Tumorperipherie pro 1 mm². P-Werte und Korrelationskoeffizienten (KK) wurden mittels Spearman Korrelation ermittelt.

Die niedrige, jedoch im Vergleich zur ITL signifikant höhere Lymphgefäßanzahl in der Tumorperipherie konnte in keinerlei signifikante Korrelation zu Expressionswerten aller untersuchten Parameter gebracht werden. Jedoch wiesen zumindest die meisten der

VEGF-Faktoren (Abbildung 3.16 A, B und C) und alle VEGF-Rezeptoren (Abbildung 3.16 E, F und G) einen positiven Korrelationskoeffizienten auf, eine Ausnahme bildete hier wiederum VEGF-D (Abbildung 3.16 D).

3.8. Überlebenszeitanalysen

3.8.1. Einfluss klinischer und histopathologischer Parameter

Überlebenszeitanalysen in Bezug zu den gesammelten klinischen Daten erbrachten keine signifikanten Unterschiede bei Geschlecht, Operationsalter, erhöhten HIES-Spiegeln im 24h-Urin, B-Symptomatik, Diarrhö oder Schmerz. Patienten mit Flush-Symptomatik überlebten dagegen signifikant kürzer (Abbildung 3.17 F).

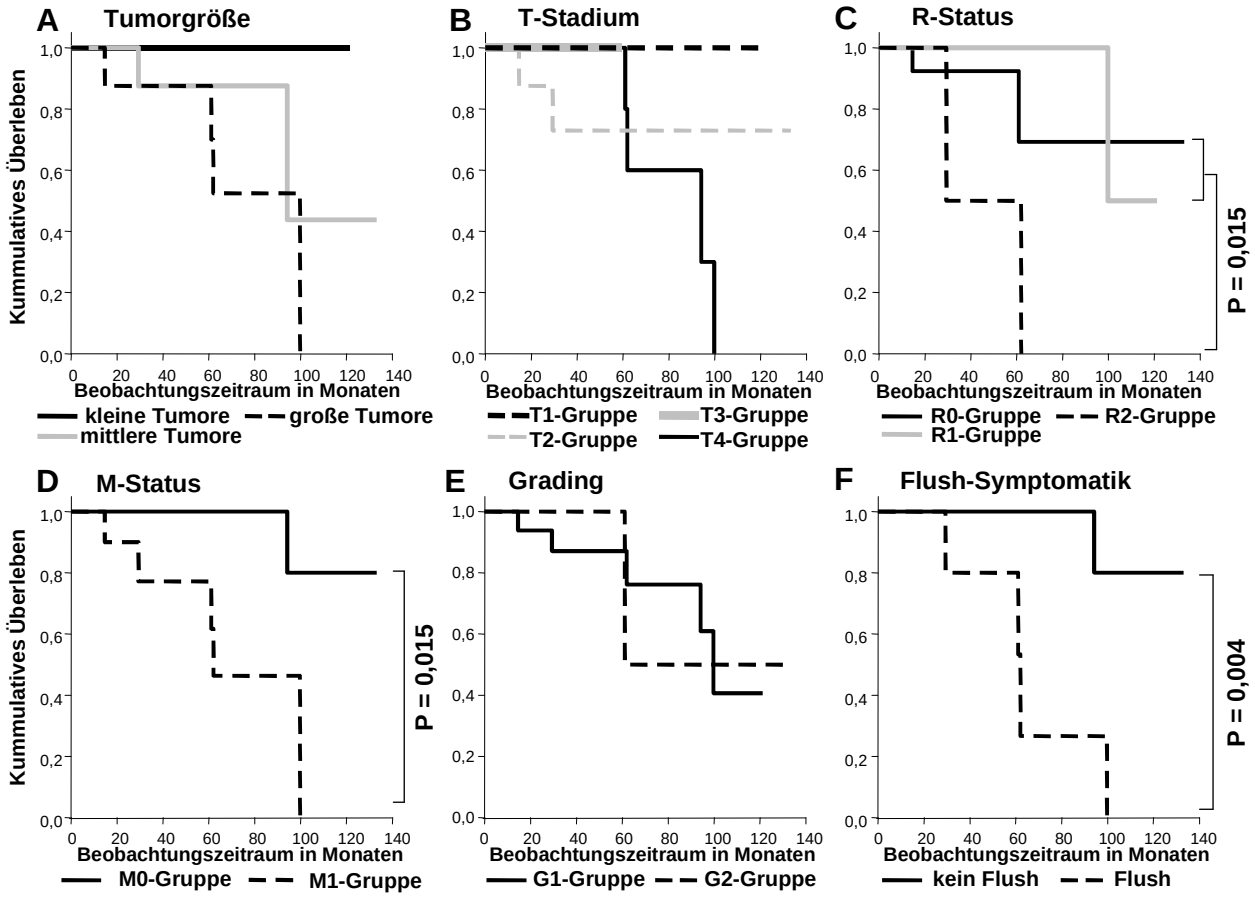


Abbildung 3.17: Überlebenszeitanalysen unter klinischen und histopathologischen Aspekten. Analysiert wurde die Auswirkung eines kleinen (≤ 10mm, n=5), mittleren (> 10mm ≤ 20mm, n=11) oder großen (> 20mm, n=9) Tumordurchmessers (**A**), des T-Status (T1 n=3, T2 n=10, T3 n=6, T4 n=6) (**B**), der operativen Entfernung des Tumors vollständig (R0, n=16), mit mikroskopischem (R1, n=5) oder mit makroskopischem (R2, n=2) Residuum (**C**), vorhandener (M1, n=15) oder fehlender (M0, n=10) Fernmetastasierung (**D**), des Tumorgrades (G1 n=19, G2 n=6) (**E**) und dem Bestehen (n=6) oder Fehlen (n=13) einer Flush-Symptomatik (**F**) auf das Überleben. Präsentiert werden die Daten als Kaplan-Meier-Kurven, der Beobachtungszeitraum ist in Monaten angegeben und P-Werte wurden mittels Survival LogRank errechnet.

Größe, T-Status, Tumorgrad (Abbildung 3.17 A, B und E) und multiple Tumorverteilung (Daten nicht gezeigt) zeigten keine Korrelation mit dem Überleben. Die operative Entfernung mit einem mikroskopischen Residuum (R1) oder der gesamten Tumormasse (R0) brachte dagegen statistisch signifikante Überlebensvorteile im Vergleich zu einer R2-Resektion mit makroskopischem Residuum (Abbildung 3.17 C). Entsprechend der Literatur wirkte sich eine Fernmetastasierung signifikant negativ auf das Überleben aus (Abbildung 3.17 D).

Adjuvante Therapien, die signifikant häufiger bei Patienten mit Fernmetastasen zum Einsatz kamen (M0 1/15 versus M1 6/10), zeigten keinen Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten. Ein Vergleich der Überlebensdaten von Patienten der M1-Gruppe mit und ohne adjuvante Therapie, ergab keinen signifikanten Unterschied. Allerdings sollten diese Ergebnisse aufgrund der Unvollständigkeit der Therapiedaten und der statistisch fraglich kleinen Kohorte unter Vorbehalt betrachtet werden.

3.8.2. Zusammenhang der Expressionsprofile mit der Überlebenszeit

Der Einfluss der Expression der untersuchten Parameter in den Primärtumoren auf das Überleben wurde mittels LogRank Survival-Test analysiert und in Abbildung 3.18 graphisch als Kaplan-Meier-Kurven dargestellt. Hierzu wurden die Patienten jeweils in eine höher und eine niedriger exprimierende Gruppe eingeteilt. Als Grenzwert wurde dabei jeweils der Mittelwert der Expressionsmittelwerte der M1- und der M0-Gruppe gewählt. Für MMP-2 (Abbildung 3.18 A), TIMP-3 (Abbildung 3.18 G) und VEGF-B (Abbildung 3.18 I) zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil eines höheren Expressionsniveaus im Primar. Weitere Parameter folgten ebenfalls diesem Trend, zumindest VMAT-1 (Abbildung 3.18 O) und VEGFR-2 (Abbildung 3.18 M) näherten sich dabei dem signifikanten Bereich.

Eine Subgruppenanalyse nach Fernmetastasierungsstatus erbrachte bei geringer Gruppengröße weder in der M0- noch M1-Gruppe eine Auswirkung hoher oder niedriger Expression im Primärtumor auf das Überleben. Eine Untersuchung einer möglichen Korrelation mit der Expression in Lymphknotenmetastasen zeigte für VEGFR-1 signifikant ein schlechtes Outcome bei niedrigen Werten. Kein statistischer Zusammenhang konnte mit Expressionswerten in hepatischen Metastasen gefunden werden. (Daten nicht dargestellt)

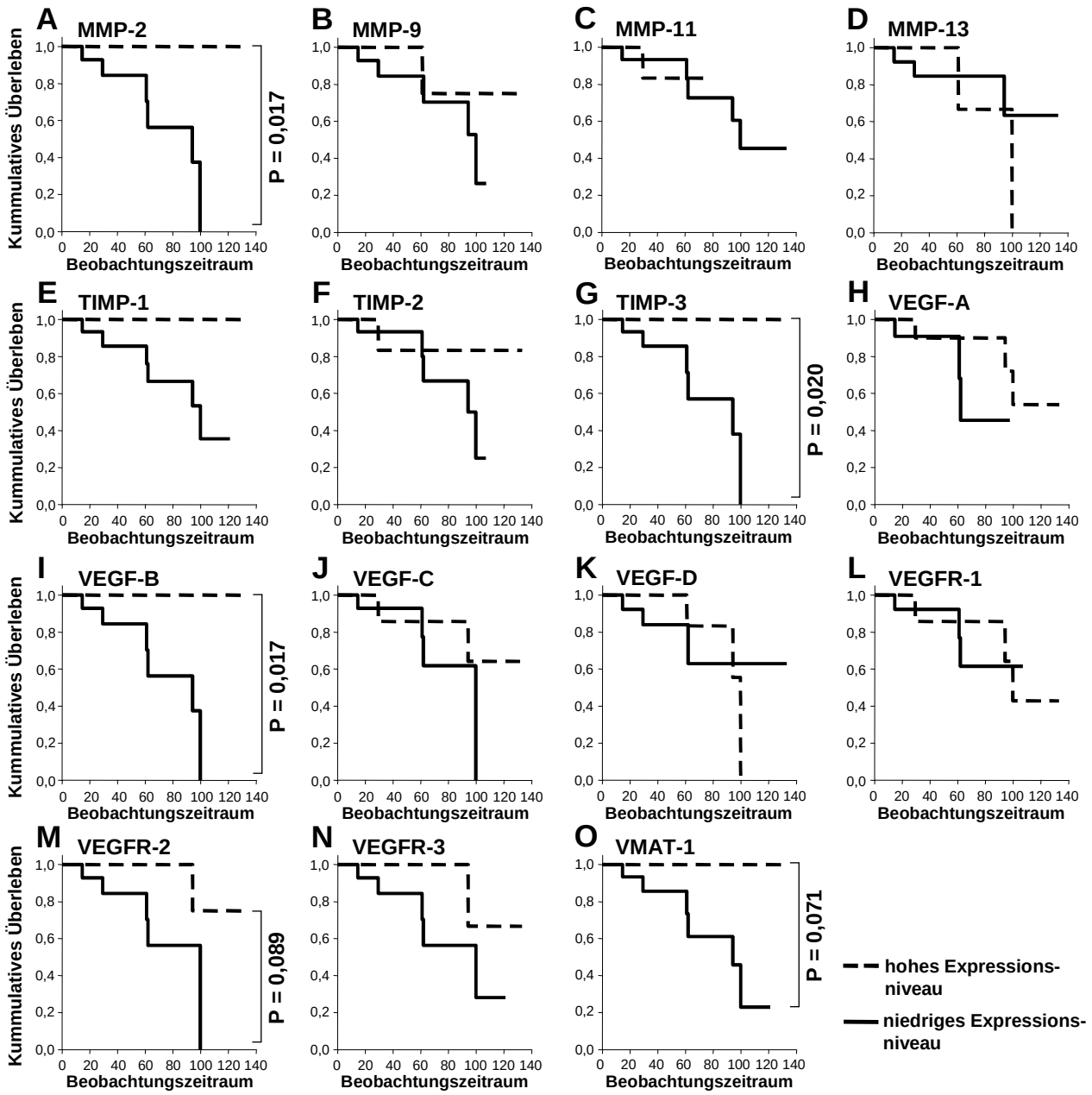


Abbildung 3.18: Überlebenszeitanalyse nach Expressionsniveau. Untersucht wurde der Einfluss der relativen Expression von MMP-2 (**A**, nE n=17, hE n=8), MMP-9 (**B**, nE n=16, hE n=9), MMP-11 (**C**, nE n=17, hE n=8), MMP-13 (**D**, nE n=16, hE n=6), TIMP-1 (**E**, nE n=17, hE n=8), TIMP-2 (**F**, nE n=16, hE n=9), TIMP-3 (**G**, nE n=17, hE n=8), VEGF-A (**H**, nE n=13, hE n=12), VEGF-B (**I**, nE n=15, hE n=10), VEGF-C (**J**, nE n=16, hE n=9), VEGF-D (**K**, nE n=14, hE n=11), VEGFR-1 (**L**, nE n=16, hE n=9), VEGFR-2 (**M**, nE n=15, hE n=10), VEGFR-3 (**N**, nE n=16, hE n=9) und VMAT-1 (**O,** nE n=18, hE n=7) im Primärtumor auf das Überleben. Solide Kurven repräsentieren Patientengruppen mit niedrigen relativen Expressionsniveaus (nE), unterbrochene Kurven Patientengruppen mit hohen relativen Expressionsniveaus (hE). Als Grenzwert galt der Mittelwert der Expressionsmittelwerte der M1- und der M0-Gruppe. Präsentiert werden die Daten als Kaplan-Meier-Kurven, der Beobachtungszeitraum ist in Monaten angegeben und indizierte P-Werte wurden mittels Survival LogRank errechnet.

3.8.3. Auswirkungen der Gefäßdichte auf die Überlebenszeit

Die Analyse der Auswirkung hoher oder niedriger Gefäßdichte auf das Überleben ergab für CD-31-positive Mikrogefäße (Abbildung 3.19 A) und LYVE-1-positive Lymphgefäße des Tumorrandbereichs (Abbildung 3.19 C) keinen statistischen Zusammenhang. Das Gleiche galt auch für die Gesamtlymphgefäßdichte (Daten nicht gezeigt). Hingegen zeigte sich ein signifikanter Überlebensvorteil bei Tumoren mit einer geringeren intratumoralen Lymphgefäßdichte (Abbildung 3.19 B).

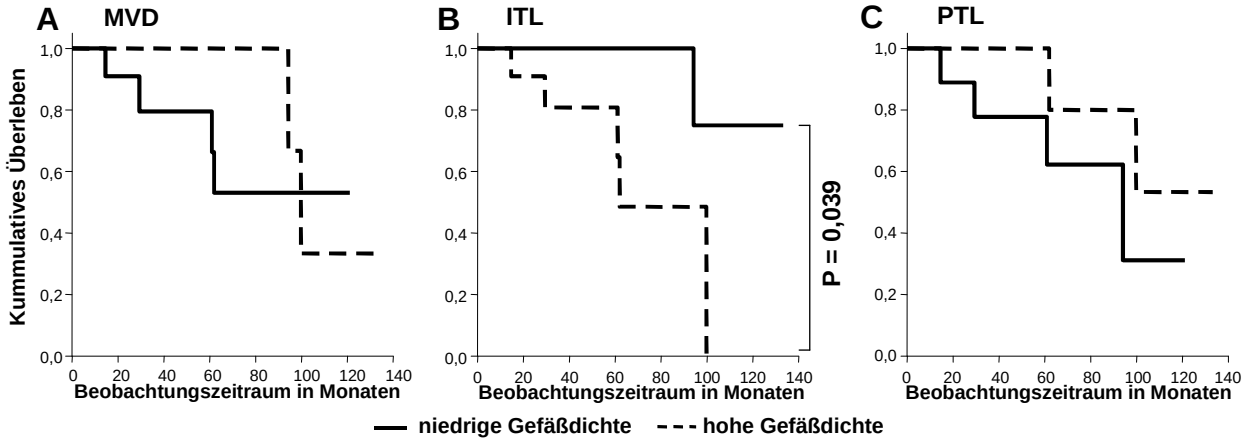


Abbildung 3.19: Überlebenzeitanalysen nach MVD, ITL und PTL. Untersucht wurde der Einfluss der mikrovaskulären Dichte (**A**), der intratumoralen (**B**) und der peritumoralen (**C**) Lymphgefäßdichte auf das Überleben. Grenzwert zwischen niedriger und hoher Gefäßdichte war der Median. Präsentiert werden die Daten als Kaplan-Meier-Kurven, der Beobachtungszeitraum ist in Monaten angegeben und indizierte P-Werte wurden mittels Survival LogRank errechnet.

Eine Subgruppenuntersuchung des Einflusses der vaskulären Dichte auf das Überleben in den Patientenkohorten mit bzw. ohne bekannte Fernmetastasierung ergab nur eine negative Auswirkung einer geringeren MVD in der M1-Gruppe. Für LVD, ITL und PTL konnte bei dieser Analyse kein Zusammenhang mit dem Überleben gefunden werden.

3.9. Zelllinien

Um für die Expression der untersuchten Parameter in neuroendokrinen Tumoren einen Vergleich mit anderen Tumorentitäten zu ermöglichen, wurden zusätzlich die Expressionsprofile diverser maligner Zelllinien erstellt. Dies umfasste abgesehen von der neuroendokrinen BON-6-Zelle, die pankreatische MIA PaCa2-, die kolorektale Caco-2-, die gastrischen AGS- und KATO-III-Zelllinien, PC-3-Zellen mit Ursprung in der Prostata und zusätzlich die nicht maligne, umbilikale Endothelzelllinie HUVEC-CS.

3.9.1. Expressionsprofile

Die Expressionsprofile der Zelllinien wurden in Abbildung 3.20 dargestellt. Dabei zeigten sich teilweise hohe Expressionsniveaus im fünfstelligen Bereich für MMP-2 (B), TIMP-1 (G), TIMP-2 (H), VEGF-C (L), VEGFR-2 (O) und besonders für VEGF-A (J).

Der EC-Zellmarker VMAT-1 (Abbildung 3.20 A) konnte nur in den enterochromaffinen Bon-6-Zellen mit pankreatischem Ursprung nachgewiesen werden. Die Karzinoidzelllinie präsentierte im Vergleich zu den übrigen Zelllinien Spitzenexpressionswerte für MMP-13 (Abbildung 3.20 F), relativ hohe Werte für MMP-2, TIMP-1, TIMP-3, VEGFR-2 und -3 (Abbildung 3.20 B, G, I, O, P) und niedrige Werte für MMP-9, -11, TIMP-2, VEGF-A, -B und -D (Abbildung 3.20 E, H, J, K, M).

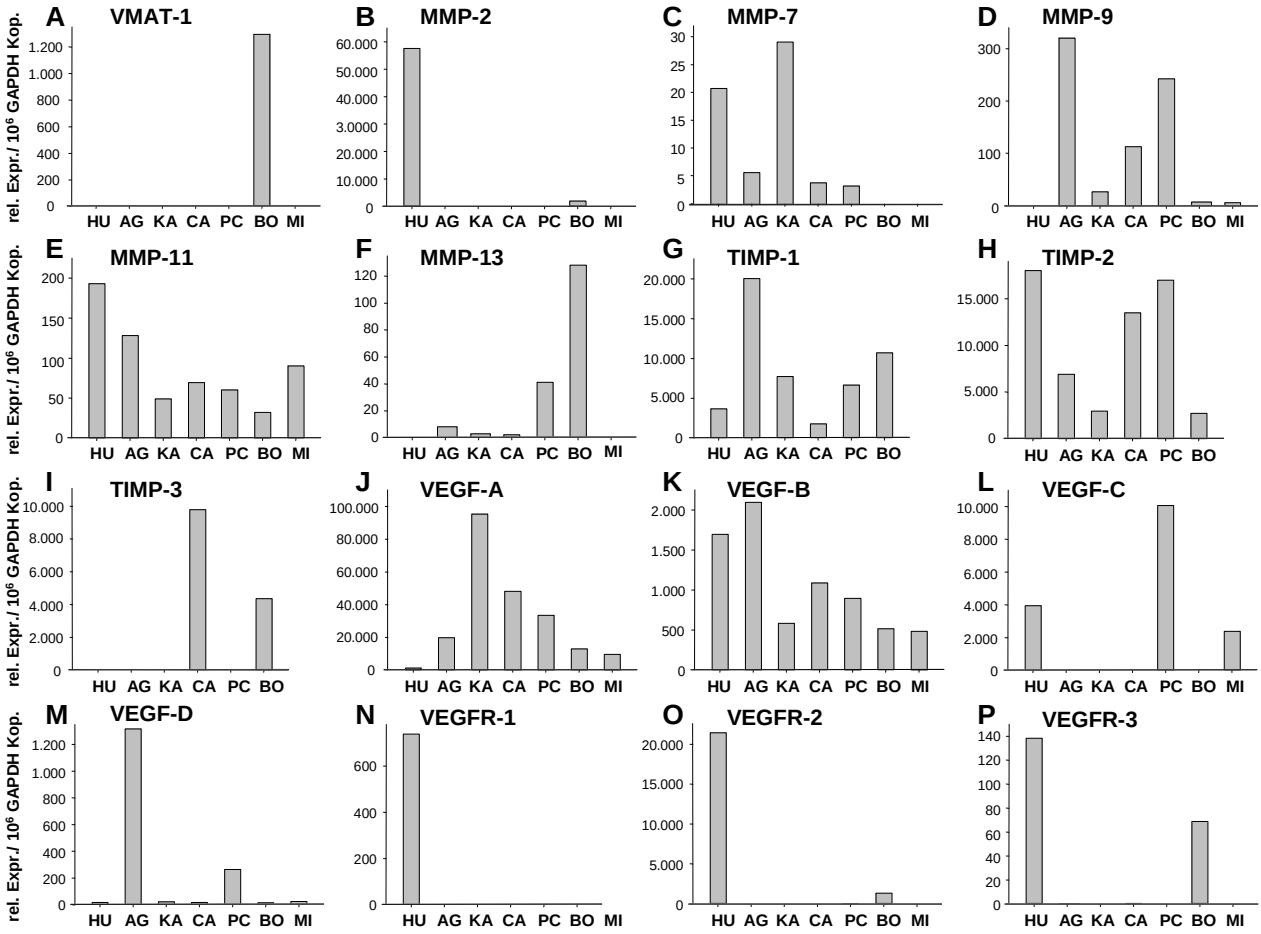


Abbildung 3.20: Expressionsprofile in Zelllinien. Dargestellt ist die relative Expression der untersuchten Parameter in den Zelllinien HUVEC (HU), AGS (AG), KATO-III (KA), Caco-2 (CA), PC-3 (PC), BON-6 (BO) und MIA PaCa-2 (MI). Die mittels quantitativer real-time RT-PCR ermittelten mRNA-Werte wurden nach Normalisierung mit 10^6 GAPDH mRNA-Kopien als relative Expression dargestellt. Der betrachtete Parameter wurde jeweils angegeben.

MIA PaCa-2, eine weitere maligne Zelllinie aus dem Pankreas, verhielt sich in der Expression von MMP-7, VEGF-A, VEGF-B und VEGF-D (Abbildung 3.20 C, J, K, M) vergleichbar zu BON-6. Jedoch wurden MMP-2, MMP-13, VEGFR-2 und VEGFR-3 (Abbildung 3.20 B, F, O, P) gar nicht, MMP-11 (Abbildung 3.20 E) dreifach höher exprimiert und das von BON-6-Zellen nicht exprimierte VEGF-C (Abbildung 3.20 L) erreichte hier vierstellige Werte.

In HUVEC-CS-Zellen, Endothelzellen der umbilikalen Vene, wurden zwar erwartungsgemäß die VEGF-Rezeptoren (Abbildung 3.20 N, O und P) deutlich höher als in den übrigen Zelllinien exprimiert, allerdings im Vergleich die vaskulären Wachstumsfaktoren A und D (Abbildung 3.20 J, M) kaum und VEGF-B und -C (Abbildung 3.20 K, L) nur im ähnlichen Rahmen wie bei den anderen Zellen. Bei den Matrixmetalloproteinasen und ihren Inhibitoren stach nur die MMP-2-Epression (Abbildung 3.20 B) und im geringen Maß MMP-11 und TIMP-2 (Abbildung 3.20 E, H) hervor.

Die Adenokarzinomzelllinien AGS, Caco-2 und PC-3 exprimierten keine bzw. kaum VEGF-Rezeptoren (Abbildung 3.20 N, O und P), ebenso kein VEGF-C (Abbildung 3.20 L), abgesehen von PC-3-Zellen, deren Expression hier deutlich hervorstach. Die relative Expression von VEGF-A lag dafür jeweils im fünfstelligen Bereich, diejenige von VEGF-B im vierstelligen (Abbildung 3.20 J und K). VEGF-D (Abbildung 3.20 M) wurde vor allem von AGS-, weniger von PC-3- und kaum von Caco-2-Zellen exprimiert. Die Expressionswerte von MMP-2, -7, -13 und TIMP-3 (Abbildung 3.20 B, C, F und I) waren in diesen Zellen sehr gering bis nicht vorhanden. Ausnahmen bildeten PC-3-Zellen bei MMP-13 und vor allem Caco-2-Zellen mit einer nahezu vierstelligen Spitzenexpression von TIMP-3. Deutlich wurden MMP-9, MMP-11 und im besonderen Maße TIMP-1 und TIMP-2 (Abbildung 3.20 D, E, G, H) exprimiert, TIMP-1 vor allem in AGS-Zellen.

Die AGS- und KATO-III-Zelllinien mit primären Ursprung im Magen exprimierten beide keine VEGF-Rezeptoren (Abbildung 3.20 N, O, P), kein VEGF-C (Abbildung 3.20 L), kein MMP-2, kaum MMP-13 und kaum TIMP-3 (Abbildung 3.20 B, E, H). Die relative Expression von MMP-11, TIMP-1, -2 und VEGF-B (Abbildung 3.20 E, G, H, K) erreichte in AGS-Zellen im Gegensatz zu KATO-III-Zellen doppelte bis dreifache Werte, deutlicher war dieser Unterschied noch für MMP-9 und VEGF-D (Abbildung 3.20 D,M). Umgekehrt expimierten KATO-III-Zellen fünf mal soviel MMP-7 und VEGF-A (Abbildung 3.20 C, J) wie die AGS-Zelllinie und zeigten für VEGF-A eine sechsstellige Spitzenexpression.

3.9.2. BON-6 und Ileumkarzinoide

Das Expressionsverhalten der neuroendokrinen BON-6-Zelllinie wurde in Abbildung 3.21 mit Werten aus Primärtumoren verglichen, dabei wurden lokal metastasierte und fernmetastasierte Tumore unterschieden. Die Gegenüberstellung machte die ungleich niedrigere relative Expression der untersuchten Parameter in der Zelllinie offensichtlich. Ausnahmen bildeten hierbei MMP-13 und TIMP-1 (Abbildung 3.21 E und F), auch die Werte für VEGF-A (Abbildung 3.21 I) lagen im annähernd ähnlichen Bereich. Insgesamt tendierten die Expressionsniveaus der BON-6-Zelllinie, die ihren Ursprung in einer Fernmetastase hat, dazu, eher mit denjenigen in Primaren mit bekannter hepatischer Metastasierung, vergleichbar zu sein. Dies galt z.B. deutlich für die MMP-13-Expression (Abbildung 3.21 E), allerdings eindeutig nicht für die Parameter MMP-11, VEGF-D und VEGFR-1 (Abbildung 3.21 D, L und M).

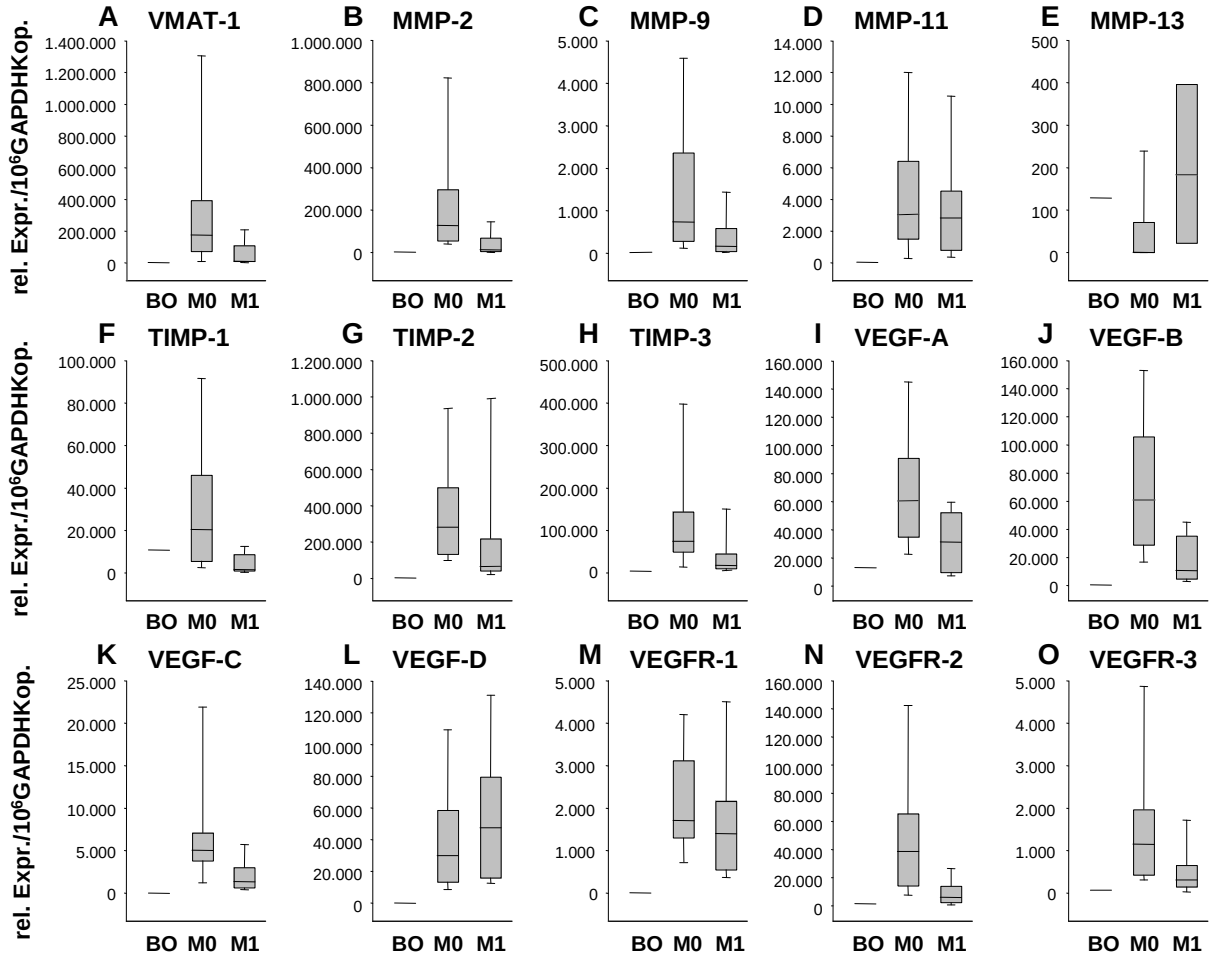


Abbildung 3.21: Vergleich des Expressionsverhaltens in BON-6-Zellen und Primaren. Gegenübergestellt wurden die Expressionsniveaus der BON-6-Zelllinie (BO), der lokal metastasierten Primare (M0, n=15) und der fernmetastasierten Primare (M1, n=10). Die mRNA-Werte wurden mit Hilfe quantitativer real-time RT-PCR ermitteltet und nach Normalisierung mit 10^6 GAPDH mRNA-Kopien als relative Expression dargestellt. Boxen entsprechen dem Median bzw. der 25./75. Perzentile, Whiskers der 5./95. Perzentile. Der untersuchte Parameter wurde jeweils angegeben. Die Anzahl der einbezogenen Proben variierte bei MMP-13 (M0 n=14, M1 n=8).

4. Diskussion

4.1. VMAT-1, Tumorgröße, Metastasierung und KI-67 als diagnostische und prognostische Parameter

Immunhistochemische Diagnostik ilealer EC-Zellkarzinoide

Histopathologisch werden EC-Zellkarzinoide durch argentaffine Anfärbbarkeit, Serotoninproduktion (80-95% der Fälle) und typische pleomorphe sekretorische Granula definiert [57;346]. Die argentaffine Eigenschaft wurde historisch zur Identifikation von EC-Zellen mittels Silberimprägnation genutzt [274;346]. Heute wird bei der Diagnostik neuroendokriner Tumore jedoch auf die immunhistochemische Färbung einer Kombination allgemeiner Gewebemarker und spezifischer Zellprodukte, wie Hormone und biogene Amine oder Peptide, zurückgegriffen [274]. Allgemeine neuroendokrine Marker, wie z.B. Chromogranin-A, Synaptophysin und neuronenspezifische Enolase (NSE), sind hoch sensitiv, jedoch nicht sehr spezifisch in allen Tumoren neuroendokrinen Ursprungs und somit auch in 92-100% der jejuno-ilealen Karzinoide nachweisbar [57;346]. Synaptophysin wird z.B. auch in schlecht-differenzierten NET exprimiert [242]. Zur weiteren Spezifizierung des EC-Zellursprungs dient deshalb die Anfärbung typischer Sekretionsprodukte, wie Serotonin oder Substanz P [274].

Im Rahmen der Routinediagnostik der Karzinoide, die in diese Studie eingeschlossen wurden, wurde eine Vielzahl verschiedener immunhistochemischer Färbungen durchgeführt. Die allgemeinen neuroendokrinen Marker Chromogranin A, NSE und Synaptophysin wurden allerdings nur bei 15 bzw. sechs Patienten untersucht, und acht Patienten wurden ohne immunhistochemische Diagnostik, allein aufgrund der karzinoidtypischen mikroskopischen Präsentation der Tumore und der entsprechenden Klinik diagnostiziert. Im Falle einer Färbung waren die Tumore für die allgemeinen endokrinen Marker beinahe durchgängig positiv. Das Monoamin Serotonin konnte, nach Komplettierung der Färbungen, in 23 der Ileumkarzinoide nachgewiesen werden.

Zur Sicherung des EC-Zellursprungs wurde in dieser Arbeit allerdings das Glykoprotein VMAT-1 genutzt. Der vesikuläre Monoamintransporter 1, auch SLC18A1 genannt, gehört zusammen mit VMAT-2 (SLC18A2) und dem vesikulären Acetylcholintransporter VAChT (SLC18A3) zur Familie der vesikulären Amin-Transporter (VATs oder auch

SLC18) [106]. Sie sind in der Membran von Sekretgranula lokalisiert und divergieren in ihrer zellulären Verteilung und Substratspezifität [110;201]. Die Monoamintransporter sind beide in der Lage Dopamin, Norepinephrin, Epinephrin und Serotonin zu transportieren. Histamin ist dagegen nur Substrat von VMAT-2 [111]. Während VMAT-2 sowohl in den neuroendokrinen Zellen des Magens („enterochromaffine like“ ECL-Zellen) und des Nebenierenmarks, als auch in enteralen, peripheren und zentralen Neuronen und zahlreichen weiteren Zelltypen zu finden ist, wird VMAT-1 in einigen neuroendokrinen Zelltypen (Nebenniere, Haut, Darm), jedoch nicht neuronal exprimiert. Im Gastrointestinaltrakt beschränkt sich sein Vorkommen fast ausschließlich auf EC-Zellen [106] und der Transporter kann in 98% der EC-Zellkarzinoide nachgewiesen werden [346].

Erwartungsgemäß war die relative m-RNA-Expression von VMAT-1 in den primären Ileumkarzinoiden und ihren Metastasen signifikant zur normalen Mukosa des Ileums, sowie noch eindrücklicher zu den duodenalen Karzinoiden, die als Negativkontrolle dienten, gesteigert. Diese Ergebnisse konnten auch immunhistochemisch auf Proteinebene bestätigt werden. Somit war es möglich, die relative Expression von VMAT-1 unter Einbezug weiterer histopathologischer Parameter als Einschlusskriterium zu nutzen.

Dabei stellte sich die Frage, ob die Aufnahme eines VMAT-1-Nachweises in die reguläre Diagnostik eines digestiven neuroendokrinen Tumors, wie von Jakobsen et al. gefordert, sinnvoll erscheint [201]. Die aktuelle ENETS-Leitlinie empfiehlt zur histopathologischen Diagnostik eines jejuno-ilealen neuroendokrinen Tumors einen immunhistochemischen Nachweis der allgemeinen neuroendokrinen Marker Chromogranin A und Synaptophysin und beschränkt die Spezifizierung des EC-Zellursprungs auf eine optionale Serotonin-Färbung [112]. Auch die Leitlinien der übrigen digestiven neuroendokrinen Tumore aus Magen, Duodenum, Appendix, Kolon, Rektum und Pankreas, sowie neuroendokriner hepatischer Metastasen unbekannten Ursprungs verzichten auf die diagnostische Nutzung der Monoamintransporter als charakteristischen Markern spezifischer Primärtumorlokalisation [115;203;389;400;422;458].

Zur näheren Analyse wurde die komplettierte Serotonin-spezifische Färbung untersucht und mit den erhobenen Daten zu VMAT-1 verglichen. Zwei der 25 Primare waren, immunhistochemisch negativ für Serotonin. Dies entsprach der Tatsache, dass nur etwa 85% der jejuno-ilealen Karzinoide dieses Hormon exprimieren [57]. Obwohl die

betroffenen Tumore der kleinen G2-Untergruppe angehörten, schien der Verlust der Fähigkeit zur Hormonproduktion aber in der vorliegenden Studie sonst keinen Zusammenhang mit einer gesteigerten Malignität zu haben. Es ergab sich auch keine Proportionalität zwischen dem Expressionsniveau von VMAT-1 und der Anfärbbarkeit für Serotonin.

Somit könnte VMAT-1 zumindest als sinnvoller ergänzender Faktor in der immunhistochemischen Diagnostik von EC-Zelltumoren dienen. Dies entspricht auch den Ergebnissen einer Studie, die die m-RNA-Expression von VMAT-1 zu einem hohen Prozentsatz im Gewebe von neuroendokrinen Tumoren des Dünndarms nachgewiesen hat [313]. Allerdings zeigt die seltene Expression des Transporters im Plasma von Karzinoidpatienten keinen Unterschied zu Werten in gesunden Probanden [313]. Ein Nutzen von VMAT-1 als Plasma-Marker für Karzinoiderkrankungen erscheint dementsprechend unwahrscheinlich.

VMAT-1 im Kontext klinischer und histopathologischer Daten

Die VMAT-1-Expression wurde hier auch im Zusammenhang mit klinischen und histopathologischen Daten betrachtet. Dabei schienen Alter, Geschlecht, der HIES-Spiegel im Urin und Symptome, wie Diarrhö und Schmerz, keinen Einfluss zu besitzen. Nur das Auftreten einer Flush- sowie einer B-Symptomatik korrelierte negativ mit dem Expressionsniveau. Dies entsprach dem signifikanten Abfall des VMAT-1-Niveaus in Tumoren mit bekannter Fernmetastasierung und großem Durchmesser, also einem fortgeschrittenem Tumorstadium. Bei der weiteren Subgruppenanalyse ergab sich eine Tendenz zu geringerer Expression bei ansteigendem T-Stadium, aber keinerlei Einfluss des Tumorgrades oder KI-67-Indexes. Als weiterer wichtiger untersuchter Parameter in dieser Arbeit, korrelierte die mikrovaskuläre Dichte positiv mit der relativen Expression von VMAT-1, wohingegen sich die Dichte intratumoraler Lymphgefäße (ITL) indirekt proportional verhielt. Dabei muss der tatsächliche pro-angiogene bzw. anti-lymphangiogene Einfluss des Monoamintransporters wohl eher angezweifelt und der statistische Zusammenhang vermutlich der positiven Korrelation mit den ebenfalls untersuchten vaskulären Faktoren angerechnet werden. Die Werte für VMAT-1 verhielten sich somit entsprechend der beinahe durchgängigen Expressionsminderung bei zunehmendem Tumorstadium in dieser Studie. Dies spiegelte sich tendenziell auch in der Überlebenszeit wieder, die bei niedrigen Expressionswerten verkürzt erschien ($P = 0,071$).

VMAT-1 ist als Transporter in der Vesikelmembran essentiell für die Serotonin-Speicherung und charakteristisch für eine Zelle enterochromaffinen Ursprungs [106;429]. Dementsprechend könnte der Verlust des Expressionsvermögens mit zunehmender Malignität des Karzinoids auf einen Entdifferenzierungsprozess der Tumorzellen hinweisen. Die m-RNA-Expression von VMAT-1 könnte, wie es bereits von Eissele et al. vertreten wurde, somit auch einen prognostischen Wert besitzen [107].
Zudem gibt es bereits Ansätze zur therapeutischen Nutzung von VMAT-1 bei EC-Zellkarzinoiden. In der Szintigraphie wird radiojodiertes MIBG, ein Norepinephrinanalogon, zur Darstellung Amin-produzierender Tumore genutzt. Welches als Substrat von VMAT-1 und -2 in den Granula enterochromaffiner Zellen akkumuliert wird und so radiotherapeutisch bei Ileumkarzinoiden wirken kann [201]. Zusätzlich wird VMAT-1 als mögliches Ziel für T-Zell-vermittelte Immunotherapie diskutiert [510]. Somit könnte die Evaluation des VMAT-1-Status von Karzinoidzellen, abgesehen von einer diagnostischen, auch eine therapeutische Relevanz in endokrinen Tumoren haben.
Die Expression von VMAT-1 in Ileumkarzinoiden besitzt somit nicht nur differentialdiagnostischen Wert, sondern möglicher Weise auch Aussagekraft über Prognose und Therapieoptionen.

Tumorgröße und prognostische Bedeutung der Histopathologie

Ileumkarzinoide werden aufgrund ihrer geringen Größe, ihrer Lokalisation und der unspezifischen Frühsymptome erst sehr spät oder zufällig diagnostiziert [158]. Entsprechend sind Dünndarmkarzinoide bei der Erstdiagnose nur zu 22-36% lokal begrenzt, 33-44% (in manchen Studien bis zu 85%) weisen bereits Metastasen in regionalen Lymphknoten auf und 22-44% Fernmetastasen, im Gegensatz dazu sind die Metastasierungsraten bei der Gesamtgruppe der Karzinoide deutlich niedriger (53% N0M0, 19% N1M0 und 13% M1) [57;316;346;493;547]. Ziele der Metastasierung bei Karzinoiden sind neben regionalen Lymphknoten (89,9%), vor allem die Leber (44,1%), aber auch die Lunge (13,6%), das Peritoneum (13,6%), das Pankreas (6,8%), das Skelett und die Haut [317;578]. Fernmetastasen können, wenn auch selten (5%), schon bei kleinen Primaren unter einem Zentimeter auftreten [242;317]. Karzinoide über 2 cm Durchmesser weisen zu 85% regionale Metastasen in den Lymphknoten auf und sind zu einem großen Prozentsatz auch hepatisch filialisiert [242]. Langfristig entwickeln 50-75% der Dünndarmkarzinoide Lebermetastasen [317;493].

Da die Ileumkarzinoide der vorliegenden Studie alle bereits regionale Lymphknotenmetastasen aufwiesen, konnten die klinischen und histopathologischen Daten nicht auf Assoziationen mit der lymphatischen Metastasierung untersucht werden. Frühere Studien verbanden den Lymphnotenstatus in jejuno-ilealen Karzinoiden allerdings nicht mit der Invasionstiefe, Mitoserate oder multiplen Primaren [57]. Der Zusammenhang einer regionalen Metastasierung mit der Tumorgröße [57;242;390], sowie ihr Einfluss auf das Überleben wird kontrovers diskutiert [158;493;547]. Allerdings schloss die hier untersuchte Karzinoidgruppe trotz der durchgängigen lymphatischen Metastasierung auch Tumore mit einem Durchmesser unter einem Zentimeter ein. Extrahepatische Metastasierung in das Peritoneum, das Fettgewebe bzw. die Appendix bestand zum Diagnosezeitpunkt bei vier Patienten der Studie, 40% wiesen Lebermetastasen auf. Die hepatische Filialisierung war entsprechend ihrer Pathophysiologie mit einer positiven HIES-Diagnostik und einer Flush-Symptomatik verbunden, letztere betraf sogar 60% der Patienten in dieser Subgruppe. Zudem waren in den Ileumkarzinoiden der M1-Gruppe die Expressionsniveaus fast aller Parameter signifikant gesenkt, die ITL hingegen signifikant gesteigert. Hepatisch filialisierte Primare neigten, wie in anderen Publikationen [57;436], nur tendenziell zu höheren T-Stadien. Der Metastasierungsstatus zeigte keinen Zusammenhang mit der MVD oder, wie auch in anderen Studien [57], einer multiplen Primarverteilung. Ebenso ließ sich hier keine Assoziation zum Tumorgrad und zur Proliferation nachweisen. Wohingegen in früheren Publikationen die Mitoserate eines jejuno-ilealen Karzinoids mit der Metastasierung korreliert [57]. Die hepatisch filialisierten Ileumkarzinoide waren allerdings signifikant mit einem größeren Tumordurchmesser verbunden, eine Verknüpfung, die viele Studien ebenfalls beobachten [57;242;436], allerdings von einigen Autoren auch abgelehnt wird [390]. Die Patienten dieser Studie mit Lebermetastasen überlebten signifikant kürzer. Dieser negative prognostische Zusammenhang wurde bereits vielfach in der Literatur beschrieben [57;158;346] und konnte nur in seltenen Fällen nicht signifikant bestätigt werden [493;547]. Dabei liegt die mediane Überlebenszeit mit einem jejuno-ilealen Karzinoid im Falle einer lokal begrenzten Erkrankung bei 115 Monaten, einer Metastasierung in lokale Lymphknoten bei 107 Monaten und einer Fernmetastasierung bei 65 Monaten [547]. Interessanterweise scheint allerdings ein lokal begrenzter Tumor keinen Überlebensvorteil gegenüber einem jejuno-ilealen Karzinoid mit regionalen Lymphknotenmetastasen zu bieten. Im Gegenteil zeigen Studien sogar teilweise schlechtere Überlebensraten bei fehlender Metastasierung (3-/5-/10-JÜL-Raten N0M0

73%/60-77%/49%, N1M0 83%/73-75%/46%, N1M1 70%/18-54%/15-30%) [158;316;547]. Vor allem die Lebenserwartung von Patienten mit Fernmetastasen wurde jedoch in den vergangenen Jahren verbessert [547]. Entsprechend lässt sich die 5-JÜL-Rate von 35-48% bei fernmetastasierten, intestinalen Karzinoiden therapeutisch auf über 69% erhöhen [346].

Der maximale Durchmesser der Ileumkarzinoide beträgt im allgemeinen Durchschnitt 2,5cm mit einer Bandbreite von 0,3 – 5,5cm. Dabei messen 13% unter 1cm, 40 % 1 bis 2cm und 47 % über 2cm [57;346]. Die untersuchten Tumore dieser Studie hatten einen durchschnittlichen maximalen Tumordurchmesser von 1,9cm und befanden sich in einem Intervall zwischen 0,3 und 5cm. Im Einzelnen waren 20% der Ileumkarzinoide ≤ 1cm, 44% 1 bis 2cm groß und 36% größer als 2cm. Die Tumorgröße korrelierte mit dem T-Stadium. Dies entspricht der Literatur, die eine Größe über 1cm fast unweigerlich mit einer Infiltration eines jejuno-ileale Karzinoids in die Muskelschicht und das anliegende subseröse Fettgewebe verknüpft [242]. Wie bereits erwähnt, sind relativ große Tumore mit einem Diameter über 2cm sehr häufig metastasiert, dennoch bestehen oft auch bei Karzinoiden unter 1cm Durchmesser Filiae [242;317]. Dies deckte sich mit Beobachtungen in dieser Arbeit. Dessen ungeachtet zeigte sich hier eine Assoziation eines größeren Primars mit einer hepatischen Filialisierung. Dies stimmte mit den Ergebnissen einiger Studien überein [57;242;436], andere sehen wiederum keinen solchen Zusammenhang [390]. Entsprechend der Korrelation mit der Metastasierung litten Patienten mit größeren Karzinoiden signifikant häufiger an Flush-Symptomen. Zusätzlich zur fast durchgängigen Expressionsminderung in großen Ileumkarzinoiden war hier auch die MVD signifikant erniedrigt. Im Gegensatz dazu stieg die intratumorale Lymphgefäßdichte mit dem Tumordiameter an. Weitere klinische und histopathologische Daten zeigten keinen Zusammenhang zur Tumorgröße. Ebenso wie in einigen früheren Studien hatte der maximale Durchmesser der Ileumkarzinoide keine signifikante Assoziation zur Überlebenszeit [57;493], andere Arbeiten konnten die Tumorgröße hingegen als negativen prognostischen Faktor identifizieren [158;242].

Aufgrund der starken Infiltration bereits kleiner jejuno-ilealer Karzinoide sind nur 15% der Tumore in einem T1-Stadium, 8% in einem T2-Stadium und 77% in einem T3- oder T4-Stadium [57;242]. Die Gewichtung in der hier untersuchten Patientenpopulation unterschied sich leicht von den Literaturangaben, die Invasion der Primare war bei 12% der Patienten im T1-, bei 40% im T2-, bei 24% im T3- und bei 24% im T4-Stadium. Eine tiefere Invasion korrelierte entsprechend der Literatur positiv mit dem

Tumordurchmesser [242]. Sowohl eine höhere ITL, als auch eine niedrigere MVD waren teilweise signifikant mit einem zunehmenden T-Stadium verbunden. Es zeigte sich sonst keine statistisch relevante Assoziation der Invasionstiefe mit klinischen oder histopathologischen Faktoren. Allerdings waren Ileumkarzinoide mit einem höheren T-Stadium tendenziell häufiger hepatisch metastasiert, ein Trend der auch in anderen Studien registriert wird [436], allerdings ebenfalls keine Signifikanz erreicht [57]. Im Gegensatz zu Beobachtungen anderer Autoren korrelierte die Tumorinvasion nicht mit der Überlebenszeit. Somit konnte ihr generell negativer prognostischer Wert hier nicht nachvollzogen werden [57;158;346].

Ileumkarzinoide weisen zu 25-35% multiple Primare auf [57;346;493]. Dabei sind die multiplen Tumore wahrscheinlicher Metastasen eines einzelnen Primärtumors, als synchrone Primare aus einzelnen Vorläuferzellen, die durch ein initiierendes Ereignis, wie z.B. einem Wachstumsfaktor, gleichzeitig zur Entartung angeregt wurden [158;346]. Mit einem Anteil von 28% entsprach die hier betrachtete Studiengruppe dem allgemeinen Intervall. Außer einer inversen Korrelation mit der gesamt Lymphgefäßdichte, konnte keine Assoziation mit klinischen und histopathologischen Daten, mit der Expression oder mit der Gefäßdichte gefunden werden. Die fehlende Verknüpfung mit der Metastasierung entsprach dabei den Ergebnissen anderer Studien [57]. Multiple Tumore werden von einigen Autoren als prognostisch ungünstig identifiziert [57;158;346]. Hier konnte hingegen, wie in einer anderen Publikation [493], keine Korrelation mit der Überlebenszeit festgestellt werden.

Synchrone oder metachrone Zweitmalignome werden in 18-34% der jejuno-ilealen neuroendokrinen Tumore beschrieben, der Großteil besteht dabei aus Adenokarzinomen des Kolons [57;158;316;346]. Möglicherweise wird dieses Phänomen durch den Einfluss der Wachstumsfaktoren, die von den neuroendokrinen Tumoren sezerniert werden, ausgelöst [316]. Ein Anteil von 20% der hier untersuchten Patienten wies ebenfalls Sekundärkarzinome auf. Es zeigte sich allerdings keine Relevanz für das Überleben.

Eine weitere typische histopathologische Eigenschaft neuroendokriner intestinaler Tumore ist eine Fibrosierung und Gewebevernarbung, die zu Obstruktion und Infarkten führen. Die Pathophysiologie dieser desmoplastischen Reaktion des Stromas ist noch nicht klar. Aber sie wird wohl nicht ausschließlich durch Serotonin verursacht, sondern entsteht vermutlich auch im Zusammenspiel mit anderen sezernierten Hormonen und Wachstumsfaktoren [346].

KI-67-Index als prognostischer Marker

Der Tumorgrad und damit auch der KI-67-Index gelten in Dünndarmkarzinoiden als prognostischer Faktor [317]. Das KI-67-Protein, auch bekannt als MKI67 oder KIA, ist in allen aktiven Phasen des Zellzyklus, jedoch nicht in G0-Phase im Nukleus nachweisbar und dadurch ein zellulärer Marker für Proliferation [432;507]. Mittels des spezifischen monoklonalen Antikörpers MIB-1 wird ein KI-67-Index ermittelt, der in vielen malignen Erkrankungen mit der Prognose assoziiert ist [432]. In jejunoilealen Karzinoiden wird der Index zur Evaluation des Tumorgrades (G) genutzt [411]. Die Indexbeträge sind jedoch in den kaum proliferierenden neuroendokrinen Tumoren im Vergleich zu anderen Malignomen, wie z.B. der Brust [283] oder Prostata [100], sehr niedrig [86]. Sie liegen durchschnittlich nur bei 2,1% [493]. Wobei Cunningham et al. Werte unter 0,5% in 75% der untersuchen ileo-coecalen Karzinoide feststellt [86]. Entsprechend der ENETS-Leitlinien definiert ein KI-67-Index < 2% ein G1-, ein Index zwischen 2% und 20% ein G2- und ein Index > 20% ein G3-Karzinoid [411] und Werte ab 2% gelten als prognostisch negativ [242]. Cunningham et al. hält sogar die Festlegung des prognostischen Grenzwertes auf 1% für notwendig [86].

Für die Ileumkarzinoide der vorliegenden Untersuchung wurde der KI-67-Index entsprechend der ENETS-Vorgaben nachevaluiert. Der durchschnittliche KI-67-Index lag bei 1,6% mit einem sehr geringen Anteil unter 0,5%. Dabei entsprachen 76% der Tumoren einem Grad 1 und 24% einem Grad 2, allerdings nur im unteren Bereich des Intervalls. Ein G3-Tumor konnte nicht identifiziert werden. Es ergab sich, abgesehen von einer Assoziation des G2-Status mit der Flush-Symptomatik, keine signifikante Korrelation des Tumorgrades mit klinischen und histopathologischen Faktoren, der Expression eines Parameters oder der Gefäßdichte. Auch das Überleben war entgegen der Leitlinien nicht mit der Graduierung verknüpft. Dieses Ergebnis blieb auch bei Verschiebung des Grenzwertes von 2% auf 1%, bzw. eine Betrachtung kontinuierlicher Index-Werte konstant.

Somit konnte die prognostische Aussagekraft des KI-67-Indexes in den typischen, langsam wachsenden, gut-differenzierten EC-Zellkarzinoiden dieser Studie eindeutig nicht bestätigt werden.

4.2. Matrixmetalloproteinasen und ihre endogenen Inhibitoren

Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist kein passives Gerüst, sondern beeinflusst das Zellverhalten auf vielfältige Weise. Dabei ist die Fähigkeit, ihre Bestandteile zu verändern, zu aktivieren oder zu inaktivieren, für eine angemessene Interaktion jeder einzelnen Zelle mit ihrer unmittelbaren Umgebung und die normale Entwicklung und Funktionalität multizellulärer Organismen essentiell [459]. Die ECM spielt auch in der Karzinogenese eine wichtige Rolle. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen können über die Tumorbiologie und mögliche prognostische und therapeutische Ansatzpunkte Aufschluss geben. Eine wichtige Gruppe von Proteasen und ihren endogenen Hemmstoffen, die Umbauvorgänge der ECM beeinflussen, bilden die Matrixmetalloproteinasen und ihre Inhibitoren. Zur ihrer Expression in Ileumkarzinoiden scheinen bisher, abgesehen von einer Publikation im Rahmen dieser Arbeit [513], keine weiteren Studien veröffentlich worden zu sein. Immerhin propagierte Tomita die MMPs als neuroendokrine Marker [494]. Jedoch sind auch diesbezügliche Daten zu neuroendokrinen Tumoren anderen Ursprungs, wie dem übrigen Magendarmtrakt, der Lunge (u.a. SCLC), dem Pankreas, der Hypophyse, der Schilddrüse (medulläres C-Zellkarzinom), der Nebenschilddrüse, dem Thymus, der Haut (Merkelzellkarzinom = primäres neuroendokrines Karzinom der Haut) und der Nebenniere (Phäochromozytom), begrenzt. Forschungsergebnisse, die zu diesem Thema recherchiert werden konnten, werden bei der Diskussion der einzelnen Faktoren erwähnt.

4.2.1. MMP-2, MMP-9, MMP-11 und MMP-13

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind Endopeptidasen, die sowohl Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), wie Kollagene, Laminine, Fibronektin, Elastin und den Proteinkern von Proteoglycanen, als auch eine Anzahl von Nicht-Matrixmolekülen spalten können [183;185;334]. Ihre katalytische Aktivität ist abhängig von Zinkionen, eine Eigenschaft die sie mit den restlichen Mitgliedern der Metzincinsuperfamilie, z.B. den ADAMs und Aggrekanen (ADAMTS), teilen [459].

Bis heute wurden 26 Mitglieder der Enzymfamilie in Wirbeltieren identifiziert, von denen 23 im auch im menschlichen Organismus nachgewiesen werden konnten [399]. Sie existieren in gelöster oder transmembran gebundener Form und wurden nach Substratspezifität, Primärstruktur und Lokalisation in sechs Untergruppen unterteilt.

Diese Gruppen umfassen Kollagenasen (MMP-1, -8, -13, -18), Gelatinasen (MMP-2, -9), Stromelysine (MMP-3, -10), Matrilysine (MMP-7, -26), transmembrane bzw. Gycosylphosphatidylinositol (GPI) verankerte Membrantyp-MMPs (MMP-14, -15, -16, -24 bzw. MMP-17, -25) und „andere“ MMPs (MMP-11, -12, -19, -20, -22, -23, -28) [511]. Sie werden meist als inaktive Zymogene in den extrazellulären Raum ausgeschüttet [237;509]. Eine Reihe verschiedener Zelltypen sind grundsätzlich in der Lage MMPs zu sezernieren [237;382]. In gesundem Gewebe ist die MMP-Expression allerdings sehr niedrig [460;509]. Zu den Inhibitoren der MMPs zählen unter anderem die TIMPs, α-2-Makroglobulin und der einzige membranständige Inhibitor RECK (reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs) dabei werden die Enzym-Inhibitor-Komplexe zumeist über Endozytose aus dem extrazellulären Raum entfernt [511].

Zusätzlich zu ihren ECM-Substraten können MMPs auch verschiedene zirkulierende Proteine, Zelloberflächenmoleküle und perizelluläre Nicht-Matrixproteine spalten und somit das Zellverhalten auf vielfältige Weise regulieren [459]. Dadurch beeinflussen sie diverse physiologische und pathologische Prozesse [556]. Unter normalen physiologischen Bedingungen sind MMPs beispielsweise in die Embryonalentwicklung, Angiogenese, Wundheilung und den Knochenumbau einbezogen [183]. Aber sie sind auch in pathologische Vorgänge, wie Magenulzera, Arteriosklerose, und generell in Entzündungsvorgänge involviert [298;509;556].

Zudem besitzen die Matrixmetalloproteinasen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung und den Progress diverser Tumore [185;334]. Dabei beschränkte sich die ursprüngliche Vorstellung darauf, die MMPs seien nur in die Gewebsinvasion und Metastasierung involviert [105]. Mittlerweile kristallisiert sich jedoch eine multifunktionale Rolle in vielen Stadien der Tumorprogression heraus [237]. Die Wirkung der Matrixmetalloproteinasen beschränkt sich dabei nicht nur auf den klassischen ECM-Abbau, sondern umfasst auch weitere komplexe Effekte, wie die Spaltung von Zelladhäsionsmolekülen und in die Zelladhäsion involvierten Rezeptoren, die Inaktivierung von Zytokinen, die Demaskierung von signalgebenden Strukturen, die Steigerung der Bioverfügbarkeit und Aktivierung von Wachstumsfaktoren, Inhibitoren oder latenten biologischen Aktivitäten einiger ECM-Bausteine sowie anderer Proteine [105;185;237;511]. Dadurch wirken MMPs in Tumoren kontextabhängig, teilweise paradox sowohl stimulierend als auch hemmend auf die Zellproliferation, Apoptose, Angiogenese und Metastasierung, vermitteln invasives Wachstum, Zellmigration, sowie EMT und beeinflussen die Immunantwort [105;185;237].

Es gibt keinen einzelnen durchgängig hochregulierten Vertreter der MMPs oder ein bestimmtes Expressionsmuster in allen Tumoren. Dies reflektiert die Heterogenität von malignen Neoplasmen. Allerdings ist eine Überexpression von MMP-1, -2, -3, -7, -9, -11, -13 und -14 in humanen Karzinomen häufig [183;237]. Die vorliegende Arbeit wurde auf die Untersuchung der Matrixmetalloproteinasen 2, 7, 9, 11 und 13 beschränkt. Wobei die mangelnde Expression von MMP-7 in den Proben weitere Analysen ausschloss.

MMP-2, auch als Gelatinase A, 72 kDa Gelatinase oder Typ IV Kollagenase, bezeichnet, besitzt zusätzlich zur üblichen MMP-Grundstruktur eine Fibronektin-Domäne, die Kollagen, Gelatin, Laminin binden kann [511]. Außergewöhnlicher Weise kann sie auch von TIMP-2, eigentlich einem endogenen Inhibitor, in Kombination mit MMP-14 aktiviert werden [72;459]. Gelatinase A ist in der Lage diverse Bausteine der ECM zu spalten, z.B. Kollagene, Gelatin, wie auch viele nicht-ECM-Proteine, z.B. TNF-α und einige pro-MMPs [185;237;459;502;509;511;556]. Der Abbau struktureller Elemente der ECM ermöglicht nicht nur die Zellmigration, sondern beeinflusst auch auf vielfältige Weise die zelluläre Signalgebung und Funktion durch Demaskierung, Freisetzung oder Inaktivierung bioaktiver Elemente in der ECM [511]. Eine direkte Zellinteraktion der Proteinase wird zusätzlich beispielsweise durch Integrin-α-v-β-3 ermöglicht [237].
Das breite Wirkungsspektrum macht MMP-2 zu einem multifunktionalem Enzym, das die meisten Stadien der Karzinogenese beeinflussen kann. Dabei überwindet die Spaltung von Komponenten der Basalmembran die erste Barriere der Tumorentwicklung. Zudem kann MMP-2 indirekt die Migration und Invasion von Zellen ermöglichen [105;459;509] und Zellproliferation stimulieren [185;511]. Die Protease inhibiert Entzündungsprozesse und ermöglicht damit Tumorzellen eine Umgehung der Immunantwort [105;502;511]. Gelatinase A wirkt zum einen pro-angiogen über die Aktivierung von VEGF durch Abspaltung des hemmenden CTGF, zum anderen aber auch anti-angiogen [105;421;511]. Sie besitzt zudem pro-metastatische, allerdings wohl auch anti-metastatische Potenz [105].

In einer Vielzahl von neuroendokrinen Karzinomen wird eine deutliche Expression von MMP-2 festgestellt, z.B. im Merkelzellkarzinom [303], Hypophysentumor [35;169], Thymom [451], in neuroendokrinen Pankreaskarzinomen, vor allem in Gastrinomen [156] und meist auch im SCLC [184;235;308]. Gelatinase A soll, parakrin durch Tumorzellen induziert, überwiegend von den Fibroblasten des Tumorstromas exprimiert

werden [237;511]. Allerdings wird in den meisten Studien explizit über eine tumorzelleigene Expression berichtet, z.B. im Magenkarzinom [246;350], Merkelzellkarzinom [121;303], partiell auch im Kolorektal- [71;82;137;373] und Pankreaskarzinom [41;210;543]. Im Allgemeinen besteht eine Überexpression des Tumors im Vergleich zum Normalgewebe, z.B. im Kolorektal- [71;145;267], Pankreas- [50;150;210] und Magenkarzinom [255;332;350]. Seltener hingegen ist die Situation invers, z.B. im medullären Schilddrüsenkarzinom im Vergleich zu normalen C-Zellen [494] und in Inselzelltumoren des Pankreas [495]. MMP-2 wird häufig mit ansteigenden Malignität stärker exprimiert, z.B. im Thymom [522], pankreatischen NET [156] und Kolorektalkarzinom [71;281;443]. Eine der wenigen Studien, die sich mit diesem Thema beschäftigen, korreliert im Mammakarzinom den KI-67-Index invers mit der Gelatinase-A-Expression [339]. Die Expression der Protease ist in vielen Karzinomtypen positiv mit höherer Invasivität bzw. mit steigendem T-Stadium assoziiert, z.B. im Magenkarzinom [326;350;542], rektalen NET [479] und Thymom [249;451], jedoch nicht im Pankreasadenokarzinom [543]. Eine signifikante Expressionsreduktion mit steigendem T-Stadium wird für Kolorektalkarzinome, kontrovers zu anderen Publikationen [219;276;433], in einer Studie beschrieben [267]. Eine Assoziation der Expressionswerte mit der Lymphknotenmetastasierung besteht nur in wenigen Tumorentitäten, z.B. im Prostatakarzinom [537], meist dagegen nicht, z.B. im Magen- [246;442], Pankreas- [210] und medullären Schilddrüsenkarzinom [70], oder inkohärent, z.B. im Kolorektalkarzinom [267;276;373;497]. Auch die Verknüpfung der Fernmetastasierung mit hohen MMP-2-Werten scheint in seltenen Fällen signifikant zu sein, z.B. im Pankreaskarzinom [509]. Oft besteht keine Assoziation, z.B. im Kolorektalkarzionom [21], oder die Studienlage ist nicht eindeutig, z.B. im Magenkarzinom [10;12]. Die Überexpression von MMP-2 gilt im Magenkarzinom als unabhängiger negativer prognostischer Faktor [255] und korreliert mit einem kürzeren Gesamtüberleben [10;12;326]. Ebenso wirkt sie negativ auf die Prognose im medullären Schilddrüsenkarzinom [70], auf das PFS mit einem Thymom [451] und die Überlebenszeit mit einem SCLC [184]. Gelatinase A korreliert jedoch nicht mit der Rezidivierung eines Kolorektalkarzinoms [21;385;433;497] und dem Gesamtüberleben mit einem Pankreaskarzinom [146;210;221;543]. Eine Verknüpfung mit einer positiven Prognostik, wie für das Gesamtüberleben im Kolorektalkarzionom [87], scheint äußerst selten, diese Studie wird allerdings durch andere, konträre Untersuchungsergebnisse relativiert [175;281].

Die Gelatinase-A-Expression war in den meisten untersuchten Zelllinien sehr niedrig, dagegen in den neuroendokrinen BON-6-Zellen stark und in den endothelialen HUVEC-Zellen im Vergleich exorbitant. In den Ileumkarzinoiden wurde MMP-2 in Relation zu den anderen Metalloproteinasen sehr hoch exprimiert, allerdings ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen normaler Ileumschleimhaut und den Primaren. Die Metastasen aus Lymphknoten und Leber exprimierten signifikant weniger Gelatinase A als die normale Ileummukosa. MMP-2-Überexpression wird mit einer ansteigenden Malignität des jeweiligen Karzinoms in Zusammenhang gebracht [509] und die Protease stimuliert die Zellproliferation und damit das Tumorwachstum [185;511]. Allerdings ergab sich in Ileumkarzinoiden kein Zusammenhang des Proliferationsindex KI-67 oder des Tumorgrades mit der MMP-2-Expression. Dies könnte sich aus der geringen Zellteilungsrate in dieser sehr langsam wachsenden Tumorentität erklären. In großen Ileumkarzinoiden sank die MMP-2-Expression zudem signifikant im Vergleich zu kleinen und mittelgroßen Primaren. Gelatinase A verstärkt die Invasivität von Tumoren auf multiple Weise [105;459;509]. Dem widersprach jedoch ebenfalls die teilweise signifikante Expressionsreduktion mit steigendem T-Stadium in Ileumkarzinoiden. Ebenso zeigte sich im Kontrast zur primär metastatisierungsfördernden Potenz [73;105] ein signifikanter Rückgang der MMP-2-Expression in hepatisch metastasierten Ileumkarzinoiden. Diese inverse Korrelation konnte für keine andere Tumorentität recherchiert werden.

Gelatinase A wirkt wie viele Matrixmetalloproteinasen paradox auf die Angiogenese [105;421;511] und ihre starke Expression in der HUVEC-Zelllinie wies hier auf eine endotheliale Assoziation hin. Im Ileumkarzinoid zeigte ihre Expression allerdings keine Verknüpfung zur mikrovaskulären Dichte der Tumore. Überraschenderweise findet sich in den Ileumkarzinoiden eine negative Korrelation zwischen MMP-2 und der intratumoralen Lymphgefäßdichte, die sich aus den bekannten Eigenschaften von der Protease nicht schlüssig erklären lässt.

Als einzige der untersuchten Metalloproteinasen konnte MMP-2 mit dem Gesamtüberleben der Patienten in Zusammenhang gebracht werden. Allerdings korrelierte eine hohe Expression hier, im Gegensatz zu fast allen anderen Studien, mit einer signifikant längeren Überlebenszeit.

Die inverse Korrelation der stark exprimierten MMP-2 mit der Tumorprogression und der Metastasierung, sowie ihre Assoziation mit einer positiven Prognose in Ileumkarzinoiden widersprachen der allgemeinen Wirkungsweise der Gelatinase A, als primär pro-kanzerogen wirkendes Enzym und negativ prognostischer Faktor, und sind mit den zur Verfügung stehenden Daten nicht zufriedenstellend zu begründen. Möglicherweise könnte eine starke MMP-2-Expression jedoch, entsprechend der Daten im medullären Schilddrüsenkarzinom [494] und in pankreatischen Inselzelltumoren [495], eine typische Eigenschaft neuroendokriner Zellen sein, die sich im Zuge der malignen Entartung mindert. Somit könnte MMP-2 als positiver prognostischer Marker für EC-Zellkarzinoide des terminalen Ileums dienen.

MMP-9, auch Gelatinase B oder 92 kDa Gelatinase genannt, ist ebenfalls in der Lage fibrilläres Kollagen nach initialer Abspaltung abzubauen [509]. Allerdings divergiert seine breite Substratspezifität für ECM-Bausteine und andere Moleküle etwas gegenüber Gelatinase A [105;185;237;502;556]. Gelatinase B kann direkt mit dem transmembranen CD44 interagieren und so z.B. Tumorzellinvasion und Angiogenese stimulieren [459]. Die Aktivierung und Freisetzung ECM-gebundener Wachstumsfaktoren induzieren Zellproliferation, dagegen besitzt Gelatinase B aber auch anti-proliferativen Einfluss, z.B. durch Spaltung des IL2-α-Rezeptors oder Inaktivierung von Wachstumsfaktoren [105;459;511]. MMP-9 wirkt vor allem in der Embryogenese aktivierend auf pro-apoptotische Moleküle und ist in der Lage durch Spaltung von Adhäsionsmolekülen, die typisch apoptotische Zellabrundung auszulösen [105]. In der Karzinogenese wirkt die Protease hingegen primär anti-apoptotisch [511]. Der invasivitätsfördernde Einfluss von MMP-9 beschränkt sich nicht nur auf den Abbau von strukturellen Elementen der ECM, sondern wird auch über CD44 und E-Cadherin-Abspaltung vermittelt [105;509;511]. Letztere scheint auch in den Wandel der Zelldifferenzierung von epithelial zu mesenchymal (EMT) und damit in die Zunahme der Tumormalignität involviert zu sein [105]. Gelatinase B kann zwar Entzündungsvorgänge stimulieren, hauptsächlich ermöglicht sie es jedoch Tumorzellen, der Immunantwort z.B. durch Inaktivierung von Chemokinen und hemmende Wirkung auf natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten zu entgehen [105;459;502;511]. Gelatinase B besitzt sowohl pro-angiogene, als auch anti-angiogene Potenz und ist beim angiogenen „Switch“ in der Karzinogenese wichtig [237;421]. Sie ermöglicht die Invasion von Endothelzellen durch Abbau der ECM und macht VEGF-A durch Abspaltung von CTGF verfügbar, aktiviert aber auch

Angiogeneseinhibitoren [105;509;511]. MMP-9 ist ebenfalls in die Pathogenese einiger nicht-maligner Erkrankungen wie z.B. die Arteriosklerose involviert [374;382;399;459].
Der Spiegel der aktiven Form und des Zymogens von MMP-9 ist in normalem „ruhendem“ Gewebe relativ niedrig [460;509]. In einigen Normalgeweben scheint keine Gelatinase B nachgewiesen werden zu können, z.B. in der Mukosa des Magens [332] und Kolons [137]. In anderen gesunden Organen zeigt sich jedoch durchaus eine deutliche Expression, z.B. in Inselzellen des Pankreas [495] und C-Zellen der Schilddrüse [494].

In Karzinomen scheint die MMP-9-Expression weit verbreitet, z.B. im SCLC [308], Thymom [451], NET des Pankreas [156], Hypophysentumor [169], Merkelzell- [303], Ösophagus- [152;354], und Magenkarzinom [332]. Für Adenokarzinome des Pankreas [42;146;150], des Kolons und Rektums [43;76;497;577] sind die Ergebnisse nicht einheitlich, dennoch ist eine grundsätzliche Expression in den Tumoren wahrscheinlich. Zumeist wird eine Überexpression der Tumoren gegenüber dem jeweiligen Normalgewebe registriert, z.B. im SCLC [217], Magen- [255;332;350], Ösophagus- [354] und Pankreaskarzinom [150;210]. Einige Tumore exprimieren auch weniger MMP-9 als ihr normales Pendant, z.B. Inselzelltumore des Pankreas [495] und das medulläre Schilddrüsenkarzinom gegenüber hyperplastischen C-Zellen [494]. MMP-9 soll, parakrin durch Karzinomzellen induziert, primär von Zellen des angrenzenden Stromas exprimiert werden [511]. Allerdings wird Gelatinase B häufig in bzw. auf Tumorzellen selbst lokalisiert, z.B. im SCLC [308;405], Thymom [475], Merkelzellkarzinom [121], Magen- [246;350], Kolorektal- [173], Pankreas- [150;543] und Schilddrüsenkarzinom [29;294]. Explizite Angaben über eine fehlende Expression der Tumorzellen sind hingegen selten. Eine Überexpression der Proteinase korreliert beispielsweise im Schilddrüsenkarzinom [294] positiv mit einer Lymphknotenmetastasierung. Widersprüchliche Studien zu Magen- [246;442;572], Kolorektal- [311;414], Pankreas- [396;543] und Ösophaguskarzinomen [152;354] bestätigen entweder eine positive Korrelation oder schließen sie aus. Fernmetastasierung ist in einem Mausmodell eines kolorektalen Karzinoms mit einer höheren MMP-9-Expression verbunden [352]. Für das Pankreaskarzinom [146;396;543] wird eine solche positive Verknüpfung teilweise beschrieben, andere Studien zeigen keine Assoziation, wie z.B. für das Merkelzell- [121] und Kolorektalkarzinom [21;352;414]. Entsprechend des Zusammenhangs von MMP-9 mit der Entdifferenzierung bzw. der EMT [105;509] ist eine Überexpression in einigen Karzinomen mit einer schlechteren Differenzierung verknüpft, z.B. im Magen- [255] und

Rektumkarzinom [497]. Allerdings fehlt diese Assoziation häufig auch gänzlich, z.B. im Kolorektal- [281] und Pankreaskarzinom [210;396]. Eine Korrelation einer MMP-9-Überexpression mit einer zunehmenden Malignität existiert z.B. im Ösophagus- [354], Kolorektal- [173;281] und follikulären Schilddrüsenkarzinom [75]. Gelatinase B ist auch mit verstärkter Tumorprogression z.B. in Hypophysentumoren [149], Schilddrüsen- [294] und Rektumkarzinomen [497], sowie partiell in Magenkarzinomen [326;442;572], assoziiert. Diverse Karzinomtypen weisen keinerlei Verknüpfung von MMP-9 mit dem Krankheitsstadium auf, z.B. das Pankreaskarzinom [543], SCLC [308] und Thymom [451;475]. Einige Karzinome assoziieren jedoch eine steigende Expression von MMP-9 mit einer verkürzten Gesamtüberlebenszeit, z.B. das Rektumkarzinom [497]. Gelatinase B gilt auch als unabhängiger negativer prognostischer Faktor für das Ösophagus- [152], Kolorektal- [76;497] und Pankreaskarzinom [327].

In den untersuchten Zelllinien wurde Gelatinase B auf einem deutlichen, aber nicht sehr hohen Niveau vor allem in Tumorzellen mit Ursprung im Magen, Kolon und Prostata, kaum in neuroendokrinen und pankreatischen Karzinomzellen und nicht in Endothelzellen exprimiert. Auch in den Ileumkarzinoiden wurden, in Relation zu den restlichen Parametern, niedrige relative Expressionswerte registriert. Die Expressionsniveaus zeigten dabei keinen signifikanten Unterschied zwischen Mukosa und malignem Gewebe. Die Protease war nicht mit der Lymphgefäßdichte oder der MVD der Karzinoide verknüpft. Letzteres entsprach der fehlenden Verknüpfung zwischen MMP-9 und dem Hauptangiogenesefaktor VEGF-A, jedoch nicht der positiven Korrelation mit VEGFR-2, sowie der generellen Rolle der Gelatinase in der Tumorangiogenese [421]. Im Ileumkarzinoid sank die MMP-9-Expression tendenziell mit dem Anstieg des Tumordurchmessers. Dagegen exprimierten G-2-Karzinoide gegenüber Tumoren niedrigeren Grades tendenziell mehr MMP-9. Aber es konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem Proliferationsindex KI-67 nachgewiesen werden. Entgegen der eigentlich invasivitätsfördernden Wirkungsweise der Gelatinase B [105;509] fiel hier das Expressionsniveau tendenziell mit steigendem T-Stadium ab. Die MMP-9-Expression in Karzinoiden mit Lebermetastasen war sogar signifikant niedriger als in EC-Zelltumoren ohne Lebermetastasen. Diese inverse Korrelation konnte für keine weitere Tumorentität recherchiert werden und widerspricht auch der eher pro-metastatischen Eigenschaft der Proteinase [105]. Die Überlebenszeit von Patienten mit einem Ileumkarzinoid schien nicht von der MMP-9-Expression beeinflusst.

Gelatinase B war invers mit dem Tumorprogress ilealer EC-Zellkarzinoide assoziiert und verhielt sich damit nicht konform mit den Ergebnissen in der überwiegenden Mehrheit der Tumorentitäten. Die komplexen und paradoxen Wirkungsmechanismen von MMP-9 können mit diesem Ergebnis durchaus in Einklang gebracht werden. Die Ursache des Überwiegens anti-kanzerogener Eigenschaften in diesem Kontext bleibt allerdings unklar. Auch hier könnte jedoch, wie bei MMP-2, nach Vorbild des medullären Schilddrüsenkarzinoms [494] und den pankreatischen NET [495] über die Möglichkeit einer typisch neuroendokrinen MMP-9-Expression, die sich im Rahmen einer Entdifferenzierung verliert, spekuliert werden. Grundsätzlich scheint die Protease, trotz ihrer mangelnden Assoziation mit der Überlebenszeit positiv prognostisch in Ileumkarzinoiden zu sein.

MMP-11, auch Stromelysin-3 genannt [33], wird aufgrund seiner stark von den anderen Stromelysinen divergierenden Struktur und Substratspezifität heute zu den „anderen MMPs“ gezählt [399]. Mit Hilfe einer zusätzlichen Furinbindungsstelle wird die Protease MMP-untypisch bereits intrazellulär aktiviert [96;380;421;509]. MMP-11-Knockout-Mäuse scheinen keinen auffälligen Phänotyp zu besitzen [459]. Physiologisch exprimieren Zellen mesenchymalen Ursprungs MMP-11 vorübergehend im Zusammenhang mit Umbauprozessen, zum Beispiel während der Embryogenese oder einer Gewebsrückbildung. Zudem ist es in die Homöostase des Epithels eingebunden [412]. Stromelysin-3 ist auch an verschiedenen nicht-malignen pathologischen Prozessen beteiligt, bei denen Gewebeumbau auftritt, wie Heilungsprozessen, Arteriosklerose und Arthritis [412;535]. Die proteolytische Fähigkeit von MMP-11 ist nur schwach ausgeprägt, betrifft aber einige Substrate, die kein Bestandteil der ECM sind [459;509;511;529]. Sein Substratspektrum innerhalb der ECM-Bausteine scheint dagegen unklar, relativ sicher schließt es jedoch keine Kollagene ein [96;208;459;509;511;529].

Die biologische Funktion von Stromelysin-3 ist allerdings trotz seiner eingeschränkten Expression und Substratspezifität relativ komplex. Es fördert Zellproliferation und hemmt, für die weitgehend pro-apoptotisch wirkenden MMPs ungewöhnlich [16], die Apoptose von Tumorzellen [105;511]. In der normalen Entwicklung fördert allerdings auch MMP-11 die Apoptose [105;185]. Ferner hemmt es die Immunantwort und kann somit in der Karzinogenese zur Umgehung der Immunüberwachung beitragen [105;556]. MMP-11 wirkt anti-angiogen [48]. Dies könnte unter anderem seinen fehlenden Einfluss

auf das Wachstum, die invasive oder metastatische Potenz bereits etablierter Tumoren erklären [349]. Konträr dazu gibt es aber auch Hinweise auf einen aktiv anti-metastatischen Effekt im fortgeschrittenen Tumorstadium [16;96]. Die Expression von MMP-11 ist vor allem im Frühstadium der Tumorentwicklung gesteigert [45;96;452]. Zu diesem Zeitpunkt fördert MMP-11 die Bildung von Primärtumoren [16;96;304;348] und ist wohl in den frühesten lokal invasiven Prozess eingebunden [16;304]. Dabei ermöglicht es Stromelysin-3 malignen Zellen, die pro-apoptotischen Anoikis-Signale der Stromazellen zu umgehen [16;134;307;398]. Entsprechend gilt MMP-11 auch teilweise als prognostisch für die Umwandlung einer Präkanzerose zu einem Karzinom [20;328]. Die Protease wird vor allem von Fibroblasten produziert [412]. Eine eigene Expressionsfähigkeit von Karzinomzellen ist selten und wird mit der EMT assoziiert [6;452].

In fast allen Tumorentitäten findet sich eine MMP-11-Expression, z.B. im pulmonalen NET [46] und Magenkarzinom [96]. Meist steigt die Expression von Stromelysin-3 mit zunehmender Malignität, z.B. im Ösophagus- [393;435], Pankreas- [50;210;407;515], Schilddrüsen- [29;189;524] und Kolorektalkarzinom [21;209;293;498]. MMP-11 korreliert im Kolorektal- [489] und Pankreaskarzinom [210] positiv, im papillären Schilddrüsenkarzinom negativ [198] und im Ösophaguskarzinom [393;435;544] und pulmonalen NET [46] nicht mit dem Lymphknotenstatus. Meist besteht keine Assoziation zwischen Stromelysin-3 und der Fernmetastasierung, z.B. in pulmonalen NET [46] und Ösophaguskarzinomen [544]. Publikationen, die einen statistischen Zusammenhang zeigen, stehen jeweils konträre Studien entgegen, z.B. im Kolorektalkarzinom [21;489]. Die Invasivität bzw. das T-Stadium korreliert positiv im Kolorektalkarzinom [450;489] und invers im papillären Schilddrüsenkarzinom [198]. Mit zunehmender Tumorgröße sinkt die MMP-11-Expression im papillären Schilddrüsenkarzinom [198] bzw. steigt im Ösophaguskarzinom [393;544]; kein Zusammenhang besteht z.B. im pulmonalen NET [46] und Pankreaskarzinom [210]. In einigen Tumorentitäten gibt es einen Zusammenhang einer hohen MMP-11-Expression mit einer kürzeren rezidivfreien und/oder absoluten Überlebenszeit, z.B. im Pankreas- [210] und Ösophaguskarzinom [435;544]. Im SCLC ist Stromelysin-3 sogar ein unabhängiger prognostischer Faktor [308]. Allerdings fehlt z.B. bei pulmonalen NET [46] und Kolorektalkarzinomen [21;450] eine Assoziation mit dem Überleben.

In Ileumkarzinoiden existierte eine deutliche Stromelysin-3-Expression, die im malignen Gewebe im Vergleich zur gesunden Ileumschleimhaut eindeutig gesteigert war. Die Differenz zwischen Primaren und Mukosa erreichte dabei Signifikanz. Die Expression von MMP-11 korrelierte allerdings, im Gegensatz zu allen anderen Parametern, ausschließlich mit TIMP-1 positiv und mit MMP-13 negativ. Es konnte im Gegensatz zum generell anti-angiogenen Effekt der Protease [48] keine Assoziation mit der MVD nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich zwar keine Verknüpfung mit der ITL oder PTL, aber eine inverse Korrelation mit der gesamt LVD. Die weiteren Subgruppenanalysen mit Hinblick auf histopathologische und klinische Eigenschaften ergaben keine signifikanten Unterschiede. Die Expression sank tendenziell mit steigendem Tumordurchmesser und zeigte keine Verknüpfung mit dem T-Stadium. Auch bezüglich der Fernmetastasierung ergab sich, im Gegensatz zu den meisten anderen untersuchten Parametern, hier kein statistisch relevanter Zusammenhang. Dies korrespondierte zwar nicht mit der beschriebenen hemmenden Wirkung der Protease auf Metastasierungsprozesse [16;96], entsprach jedoch den Beobachtungen in den meisten anderen Karzinomen. Ebenso ergab sich keine Assoziation der Stromelysin-3-Expression mit dem Überleben der Patienten.

MMP-11 wurde in den Ileumkarzinoiden zwar exprimiert, zeigte aber keinen Zusammenhang mit klinischen oder histopathologischen Parametern oder der Überlebenszeit der Patienten. Es besitzt also weder einen prognostischen Wert, noch kann es als diagnostischer Marker für die Aggressivität des Tumors, wie im kolorektalen Karzinom in Betracht gezogen werden. Da hier allerdings nur Tumore im fortgeschrittenen Stadium (N1M0 bzw. N1M1) betrachtet wurden, entsprach diese Beobachtung der Erkenntnis, dass Stromelysin-3 bei bereits etablierten Tumoren keinen Einfluss auf das Wachstum, die invasive oder metastatische Potenz hat [349]. Die Funktion von MMP-11 wird vor allem mit dem Frühstadium der Tumorentwicklung in Verbindung gebracht und dabei für essentiell erachtet [16;349;412]. Deswegen kann eine Rolle in der frühen Karzinogenese des Ileumkarzinoids nicht ausgeschlossen werden.

MMP-13, auch Kollagenase-3 genannt, besitz im Vergleich zu anderen Matrixmetalloproteinasen eine breite Substratspezifität. Diese umfasst sowohl Bausteine der ECM, als auch Nicht-Matrix-Proteine [72;174;244;245;270;399;459;509;529;556]. Diese proteolytische Multifunktion könnte die Ursache für die sehr begrenzte physiologische Expression in gesundem Gewebe sein. Eine deutliche MMP-13-Expression scheint vor allem auf Situationen beschränkt, in denen rascher Umbau des kollagenen ECM erforderlich ist, wie zum Beispiel bei der fötalen Knochenentwicklung, in der Wundheilung oder Karzinogenese [133;509]. So ist es nicht verwunderlich, dass MMP-13-Knock-out-Mäuse einen nur geringfügig veränderten, vitalen und fertilen Phänotyp besitzen [127]. Unter pathologischen nicht-malignen Bedingungen findet sich eine starke Expression, z.B. bei der Arthritis, chronischen Ulzera, chronischer Parodontitis und arteriosklerotischen Plaques [509]. MMP-13 wird oft von Fibroblasten und Tumorzellen in invasiven Randbereichen exprimiert [72;529]. Zusätzlich zur Hemmung durch die üblichen Inhibitoren kann die Protease auch über einen hoch affinen Rezeptor LRP-vermittelt (lipoprotein receptor-related protein) endozytiert und so aus dem Extrazellularraum entfernt werden [135;421;459]. MMP-13 ist ebenfalls nicht nur in Umbauprozesse der ECM involviert, sondern besitzt eine Vielzahl anderer, zum Teil widersprüchlicher Funktionen. Kollagenase-3 beeinflusst beispielsweise die Blutgerinnung [174] und die Aktivierung von proMMPs [529]. Zusätzlich wirkt es anti-inflammatorisch, apoptotisch, proliferativ [511], sowie chemotaktisch [504] und fördert invasives Wachstum [105]. MMP-13 stimuliert durch Abspaltung des CTGFs von VEGF-A die Angiogenese und hemmt sie durch Freisetzung von Endostatin [421].

MMP-13 wird in zahlreichen Tumorentitäten, wie z.B. im SCLC [308] und Pankreasadenokarzinom [42], nachgewiesen. Teilweise zeigt sich dabei eine Überexpression im Vergleich zum Normalgewebe, z.B. im Schilddrüsen- [29], Ösophagus- [113], Magen- [108] und Kolorektalkarzinom [271]. Dagegen findet sich beispielsweise im Merkelzellkarzinom keine Expression der Kollagenase-3 [303]. Eine Korrelation mit der Progression der Karzinomerkrankung, wie einem höheren Tumorstadium und eine Lymphknotenmetastasierung im Mammakarzinom [30;133;344;565], wird in den vorhandenen Publikationen nicht sehr häufig nachgewiesen. Im Speziellen wird der Zusammenhang der MMP-13-Expression mit Fernmetastasierung selten explizit betrachtet und dann meist ausgeschlossen, wie z.B. im Magenkarzinom [108] und SCLC [308]. Das Gleiche gilt auch für die Tumorgröße. Teilweise behilft man sich bei der Analyse der MMP-13-Expression auch mit einem

Tumor/Normalgewebe-Quotienten, z.B. in Ösophagus- [113] und Kolorektalkarzinomen [271]. Häufiger hingegen wird ein Zusammenhang mit der Tumoraggressivität nachgewiesen, z.B. im Schilddrüsen- [29] und Mammakarzinom [30;133;344;565]. In einigen Untersuchungen erweist sich ein Zusammenhang zwischen der MMP-13-Expression und einem kürzeren Gesamtüberleben, z.B. beim Magenkarzinom [95;108]. Die Ergebnisse für andere Karzinomtypen sind allerdings entweder widersprüchlich, z.B. im Ösophagus- [113;152] und Kolorektalkarzinom [37;87;175;271], oder zeigen keine Assoziation, z.B. im SCLC [308].

In Ileumkarzinoiden war die Expression von MMP-13 im Vergleich zu den anderen untersuchten Metalloproteinasen sehr niedrig und zeigte keinen Unterschied zwischen malignem Gewebe und Ileummukosa. Allerdings führten die Daten in der weiteren Analyse zu ungewöhnlichen Ergebnissen. MMP-13 korrelierte entweder nicht oder negativ mit allen anderen untersuchten Expressionsparametern. Kollagenase-3 besitzt sowohl pro-angiogene, als auch anti-angiogene Aspekte [421]. Allerdings zeigte die Expression des Faktors keinen Zusammenhang mit der MVD. Mit den wichtigsten angiogenen und lymphangiogenen Faktoren und Rezeptoren bestand zudem eine inverse Assoziation. Dementsprechend überraschend war die positive Korrelation mit der ITL. Ein möglicher Zusammenhang mit dem Tumor/Stroma-Quotienten im Hinblick auf die Expression von MMP-13 in Fibroblasten [382] könnte dieses Ergebnis jedoch vielleicht im Rahmen nachfolgender Experimente erklären. Kollagenase-3 war zudem der einzige Parameter, der mit Fortschreiten der Tumorerkrankung statistisch relevant stärker exprimiert wurde und sich so entsprechend seiner generell pro-invasiven und proliferativen Wirkung verhielt [105;511]. Die Expression stieg mit einem höheren Tumorgrad und teilweise auch signifikant mit einem zunehmenden T-Status an. Außerdem waren die Expressionsniveaus in großen, ebenso wie in hepatisch filialisierten Karzinoiden signifikant höher als in kleinen oder mittelgroßen bzw. lokal begrenzten Primaren. Allerdings zeigte sich kein Zusammenhang mit der Überlebenszeit der Patienten.

MMP-13 war, abgesehen von der ITL, der einzige untersuchte Parameter, der eine negative prognostische Aussagekraft besaß. Somit könnte die Protease, trotz ihrer fehlenden Assoziation zum Gesamtüberleben, nicht nur als prognostischer Marker dienen, sondern möglicherweise auch einen therapeutischen Ansatz bieten. Zumal ein entsprechender spezifischer Inhibitor bereits existiert [387].

4.2.2. TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3

TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) sind endogene Inhibitoren der Metalloproteinaseaktivität, im Speziellen der MMPs, können aber auch einige ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) und Aggrekanasen (ADAMTS) inhibieren [25;462]. Sie bilden ein Gegengewicht zur proteolytischen Wirkung der MMPs und haben somit eine entscheidende Rolle in der Homöostase der ECM [206]. Die vier Vertreter der TIMP-Familie, die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die ersten drei, besitzen eine starke Sequenzhomologie und setzen sich aus zwei strukturellen Domänen zusammen. Die N-terminale Domäne ist dabei entscheidend für die MMP-Hemmung [72;460]. Die keilförmigen TIMPs fügen sich einem Substrat ähnlich in das aktive Zentrum der MMPs ein und bilden 1:1-Enzym-Inhibitor-Komplexe [52;511]. TIMP-1, -2 und -4 existieren in gelöster Form, während TIMP-3 an die ECM gebunden ist [460]. Sie können von einer Vielzahl von Zelltypen produziert werden, z.B. Keratinozyten, Fibroblasten, Osteoblasten, Endothelzellen [456] und ihre Expression kann auf der Transkriptionsebene über verschiedene Wachstumsfaktoren, Zytokine, Retinoide und Glukokortikoide reguliert werden [237;456]. Knock-out-Mäuse sind jeweils lebensfähig und fertil, entwickeln aber im Fall von TIMP-3 später emphysemartige Veränderungen und bei fehlendem TIMP-1 eine erhöhte Infektresistenz, aufgrund einer stärker ausgeprägten Entzündungsreaktion und komplementabhängigen Immunreaktion [25]. Unter physiologischen Bedingungen, wie beispielsweise einer Schwangerschaft, sind die TIMPs an der Angiogenese und dem Umbau von Gewebe beteiligt [7;25;237;399]. TIMP-assoziierte nicht-maligne Erkrankungen sind z.B. Arthritis [237], Arteriosklerose, Nephropathien [374] und chronisch entzündliche Darmerkrankungen [382].

Das ursprüngliche Konzept, die TIMPs würden über die Inhibition der MMP-Aktivität der Entstehung und Progression von malignen Erkrankungen ausschließlich entgegenwirken, stellt sich als zu vereinfacht heraus und synthetische MMP-Inhibitoren versagen bei klinischen Tests zur Krebstherapie [460]. Zum einen besitzen einzelne MMP-Vertreter durchaus hemmenden Einfluss auf die Tumorentwicklung [127;301], z.B. MMP-9 [83], MMP-11 [16;96], zum anderen sind TIMPs multifunktionale Proteine, die auch MMP-unabhänig wirken [206]. Sie regulieren Zellproliferation, Apoptose und Angiogenese auf teilweise paradoxe Weise und wirken somit sowohl stimulierend als auch inhibierend auf die Tumorgenese und –progression [206]. Den Ausschlag für ihre Wirkungsweise scheinen diverse Faktoren zu geben. Die TIMP-Funktion ist abhängig

von der Lokalisation, der Konzentration, dem Zeitpunkt und der jeweiligen Menge von Assoziationspartnern, wie MMPs und Rezeptoren [206]. Grundsätzlich scheint es einen Trend zur pro-kanzerogenen Wirkung in der Frühphase der Tumorentstehung und zu einem überwiegend hemmenden Einfluss in der Spätphase eines bereits etablierten Tumors zu geben, dabei stimulieren die TIMPs allerdings wahrscheinlich auch das Wachstum von Mikrometastasen [206]. Somit sind auch Studien verschiedener Karzinomtypen, die eine Assoziation einer erhöhten TIMP-Expression mit der Progression eines Karzinoms und mit einer schlechten Prognose ergeben, erklärlich [206]. TIMPs sind Proteine mit vielfältigen biologischen Effekten und ihre Assoziation zur Tumorbiologie der Ileumkarzinoide soll hier näher betrachtet werden.

TIMP-1, ursprünglich auch als EPA (erythroid potentiating activity) bekannt, ist als frei lösliches Protein meist in der ECM nahe an Zelloberflächen lokalisiert [25;72], kann allerdings auch über Rezeptoren an der Zelloberfläche gebunden oder endozytiert werden [52]. Das Vorkommen des Inhibitors ist in verschiedenen Geweben offenbar situationsbedingt von Transkriptionsregulation und Verbrauch beeinflusst [460]. Unter physiologischen Bedingungen, wie der Schwangerschaft, ist TIMP-1 an der Angiogenese und dem Umbau von Gewebe beteiligt [237;399;511]. Bei der Hemmung der MMPs, sowie der ADAMs, zeigt TIMP-1 aufgrund von Affinitätsunterschieden eine gewisse Selektivität [25;459;460;511] und ist möglicherweise in die Aktivierung von proMMP-9 involviert [25;72;147]. Allerdings existieren auch MMP-unabhängige zelluläre Bindungspartner von TIMP-1 wie z.B. CD63 [206;218;299]. Das Protein ist so in der Lage, auch direkt intrazelluläre Signalkaskaden zu beeinflussen [25;206;460]. Die Wirkungsweise von TIMP-1 auf das Zellwachstum, die Apoptose und die Angiogenese ist paradox und das konkrete Überwiegen des hemmenden oder stimulierenden Anteils ist vermutlich abhängig von einer Vielzahl von Einflüssen. Grundsätzlich wirkt der Inhibitor anti-proliferativ sowohl MMP-abhängig über Hemmung der Wachstumsfaktoraktivierung und Konservierung der intakten ECM [72], als auch MMP-unabhängig z.B. über CD63 durch einen G1-Zellzyklusarrest [460]. Allerdings existiert auch eine MMP-unabhängige mitogene Wirkung von TIMP-1 [52;206;460]. Eindeutig ist dagegen die MMP-unabhängige anti-apoptotische Eigenschaft von TIMP-1 [299;460]. Die Hemmung der MMPs hat entsprechend deren Wirkung sowohl anti-angiogene, als auch pro-angiogene Aspekte [206;353;421]. Zudem induziert TIMP-1 direkt die Expression von VEGF-A und damit das Gefäßwachstum [206;557].

Der komplexen Funktionsweise von TIMP-1 entsprechend, ist auch sein Einfluss auf Karzinome teilweise widersprüchlich. Es wird sowohl mit der Hemmung [185] als auch mit der Steigerung [25] des Tumorzellwachstums, mit pro-angiogener und anti-angiogener Wirkung [25], sowie der Hemmung der Invasivität von Tumoren [148;299] in Verbindung gebracht. Zusätzlich wird sowohl von hemmenden [148;459], als auch von stimulierenden [25;459] Auswirkungen des Inhibitors auf die Metastasierung berichtet. Möglicherweise begünstigt TIMP-1 initial die Karzinogenese und unterdrückt im späteren Verlauf die Tumorprogression [460].

Die Expression von TIMP-1 kann in vielen Tumortypen deutlich nachgewiesen werden, z.B. im Kolorektalkarzinom [414], Magenkarzinom [255], Phäochromozytom [355] und in Inselzelltumoren des Pankreas [495]. TIMP-1-Überexpression gegenüber dem Normalgewebe zeigt sich im SCLC [217], medullären Schilddrüsen- [494] und Magenkarzinom [350]. In pankreatischen Inselzelltumoren wird das Protein jedoch signifikant weniger als im Normalgewebe exprimiert [495]. Inkohärente Angaben zu Expressionsunterschieden zwischen Tumoren und dem entsprechenden Normalgewebe finden sich z.B. bei Kolorektal- [27;82;141;330;416;562], Pankreas- [150;210;327] und papillären Schilddrüsenkarzinomen [153;294]. Es gibt Tumorzellen, die eindeutig eine höhere Expression als das umgebende Stroma zeigen, z.B. im papillären Schilddrüsenkarzinom [294], andere exprimieren signifikant weniger, z.B. im Magen- [211;350] und Kolorektalkarzinom [212;562]. TIMP-1 ist z.B. im medullären Schilddrüsenkarzinom direkt mit der Malignität assoziiert [494], während im Phäochromozytom kein entsprechender Zusammenhang gefunden wird [355]. Eine Assoziation des Inhibitors mit der Invasionstiefe bzw. dem T-Status, sowie der Tumorgröße fehlt im Ösophagus- [323;354], Kolorektal- [212;219;414;562] und Pankreasadenokarzinom [210;543]. Studien zum Magenkarzinom widersprechen sich mit Angaben einer direkten [310;558], inversen [572] oder fehlenden [350] Korrelation mit der Invasionstiefe. TIMP-1-Überexpression korreliert z.B. im Ösophaguskarzinom [323] mit der Lymphknotenmetastasierung, jedoch nicht im Magen- [442;558] und Pankreaskarzinom [543]. Eine positive Korrelation des Fernmetastasierungsstatus mit der TIMP-1-Expression zeigt sich im Mammakarzinom [402;512], hingegen nicht im Pankreasadeno- [543] und Merkelzellkarzinom [121]. Widersprüchlich sind die Studien hinsichtlich des Zusammenhangs mit der Fernmetastasierung im Kolorektalkarzinom [21;212;330;352;414;562]. TIMP-1 gilt als unabhängiger negativ prognostischer Faktor im Ösophagus- [323] und Magenkarzinom [310]. Allerdings zeigen viele Studien keine

Assoziation der TIMP-1-Expression mit der Überlebenszeit, z.B. im Thymom [451], Merkelzellkarzinom [303] und SCLC [184;308] oder sind in ihren Aussagen widersprüchlich, z.B. im Ösophagus- [323;435], Magen- [211;255;558;572] und Pankreaskarzinom [210;327;409;543]. Eine einzelne Studie über das Kolorektalkarzinom zeigt im Kontrast zu anderen Studien [212;321;330;385;414;497] auch einen positiven Einfluss der TIMP-1-Expression auf die Überlebenszeit [321].

In Ileumkarzinoiden wurde TIMP-1 hoch, aber unter den im Gesamtvergleich stark exprimierten TIMPs relativ am geringsten exprimiert. Es zeigte sich ein signifikant niedrigeres Expressionsniveau in der normalen Mukosa als im Primärtumor und in den Lymphknoten- und Lebermetastasen. Die Expression von TIMP-1 korrelierte negativ mit derjenigen von MMP-13 und positiv mit der Expression der restlichen MMPs und TIMPs. Aber es bestand auch eine direkte Proportionalität mit den Werten einiger angiogenen Wachstumsfaktoren und Rezeptoren, wie z.B. VEGF-A, das die Synthese und Sekretion von TIMP-1 senkt [266], aber selbst von TIMP-1 induziert wird [206;557]. Die MVD zeigte, wie auch die PTL, trotz dieser Assoziation, keinen statistischen Zusammenhang mit TIMP-1. Allerdings korrelierte die intratumorale lymphatische Gefäßdichte aus ungeklärten Gründen invers mit der TIMP-1-Expression. Eine Assoziation zwischen fallender TIMP-1-Expression und steigendem T-Stadium deutete sich, entsprechend des allgemein hemmenden Einflusses auf die Invasivität [148;299], zwar an, erreichte allerdings, ebenso wie die inverse Tendenz zur Tumorgröße, keine Signifikanz. Auch der Proliferationsindex KI-67 konnte, ebenso wie die aus ihm resultierende Graduierung, in Karzinoiden des Ileums nicht mit TIMP-1 in Zusammenhang gebracht werden. Dagegen wurde der Inhibitor in Tumoren mit Fernmetastasen signifikant niedriger als in ausschließlich lokal metastasierten Tumoren exprimiert. Dieses Ergebnis deckte sich somit mit der Theorie einer hemmenden Wirkung von TIMP-1 auf die Metastasierung [148;459]. Die signifikante Assoziation niedriger TIMP-1-Werte mit klinischen Symptomen, wie Flush, B-Symptomatik und Diarrhöe, erscheint in den ilealen Karzinoiden unter dem Aspekt der inversen Korrelation mit der Fernmetastasierung folgerichtig, da Patienten eine typische Karzinoidsymptomatik erst mit Filialisierung in die Leber entwickeln [314]. Ein hohes TIMP-1-Expressionsniveau schien sich tendenziell positiv auf die Überlebenszeit der Patienten auszuwirken, dies erreichte allerdings keine Signifikanz.

Die Expression von TIMP-1 sank in ilealen Karzinoiden signifikant mit fortschreitendem Krankheitsstadium und tendenziell mit kürzerer Überlebenszeit. TIMP-1 könnte insofern prognostischen Wert für die Tumorprogression besitzen. Die Regression der Expression in fernmetastasierten EC-Zelltumoren könnte darauf hinweisen, dass TIMP-1 auch in dieser Tumorentität vor allem einen karzinogenen Einfluss in der Frühphase der Tumorentwicklung hat, später aber eher hemmend auf den Progress der Karzinomerkrankung wirkt [460].

TIMP-2 wird im Gegensatz zu den anderen Familienmitgliedern hauptsächlich konstitutiv und somit in hohen Spiegeln in allen Geweben exprimiert [351;456;463]. Dabei findet er sich in löslicher Form und im ECM vor allem in direkter Nähe von Zelloberflächen [25]. TIMP-2 besitzt als Inhibitor eine Affinität für alle MMPs, wirkt jedoch nicht auf die ADAM-Familie [25]. Das Protein ist allerdings zusammen mit MMP-14 in die Aktivierung von proMMP-2 involviert [72]. Zusätzlich besitzt TIMP-2 Einfluss auf Zellwachstum, Apoptose und Angiogenese. Es wirkt mitogen auf Erythrozytenvorläuferzellen und eine Vielzahl weiterer Zelltypen [25;52;206;460;511]. Von der MMP-Hemmkompetenz unabhängig kann TIMP-2 über das membranständige MMP-14 Proliferation induzieren, jedoch im Gegensatz dazu die Proliferation und Migration von Zellen über membrangebundenes Integrin-α-3-β-1 auch hemmen [353;397;460;463]. Zusätzlich wirkt der Inhibitor auch MMP-abhängig anti-proliferativ über die Konservierung sowohl der ECM-Struktur als auch der Latenz von Wachstumsfaktoren [72]. TIMP-2 weist einerseits anti-apoptotische, andererseits pro-apoptotische Wirkungen auf [299;460]. Ebenso zwiespältig ist seine MMP-abhängige Rolle in der Angiogenese [206;353;421]. TIMP-2 besitzt allerdings, unter anderem durch MMP-unabhängige Hemmung der Proliferation und Migration von Endothelzellen, vorrangig anti-angiogene Eigenschaften [206;353;462;463]. Die Wirkung von TIMP-2 ist also ebenfalls komplex und abhängig vom jeweiligen zellbiologischen Kontext und der Konzentration [459;460;463]. Der Inhibitor ist im Gegensatz zu den MMPs auch im normalen Gewebe in relativ großen Mengen vorhanden, seine Funktion ist dabei möglicherweise die Gewebshomöostase bei Fluktuationen der Wachstumsfaktormenge [462], sowie die Erhaltung und Induktion von Zelldifferenzierung, wie z.B. bei der Neuritendifferenzierung [384]. Das Protein wird vor allem von Stromafibroblasten, perivaskulären glatten Muskelzellen und Endothelzellen exprimiert [462], aber auch die Expression durch Karzinomzellen wurde dokumentiert.

Grundsätzlich soll TIMP-2 das Wachstum [52;511], die Invasion [148;206], Angiogenese [25;299] und Metastasierung [148] von Tumoren reduzieren. Allerdings erweist sich die Wirkung des Proteins in diversen Studien als karzinogen. In zahlreichen verschiedenen Tumorentitäten korreliert die Expression von TIMP-2 direkt mit der Malignität z.B. im SCLC [230], Thymom [522], Ösophagus- [354;435], Magen- [246] und Kolorektalkarzinom [498]. Eine im Gegensatz dazu inverse Verknüpfung gibt es selten. TIMP-2 wird in vielen neuroendokrinen Tumoren deutlich exprimiert, z.B. im Hypophysenadenom [169], medullären Schilddrüsenkarzinom [494] [252] und in Inselzelltumoren des Pankreas [495]. Im Merkelzellkarzinom lässt sich der Inhibitor jedoch kaum nachweisen [121;303]. Die TIMP-2-Expression von Tumorzellen ist gegenüber der Stromaexpression z.B. im SCLC [308] und Schilddrüsenkarzinom [294] erhöht, dagegen im Magenkarzinom erniedrigt [211;246]. Kein Tumor-Stroma-Unterschied findet sich z.B. im Thymom [475]. Kontrovers sind hier Studien zum Kolorektal- [71;212;330] und Pankreaskarzinom [210;543]. Hinsichtlich der TIMP-2-Expression zwischen Karzinomen und gesundem Gewebe besteht z.B. im Schilddrüsen- [29;252;294] und Pankreaskarzinom [210], sowie in Hypophysentumoren [243] und adrenalen Tumoren [248] kein signifikanter Unterschied. Allerdings wird TIMP-2 auch in einigen Tumoren überexprimiert, z.B. im Ösophaguskarzinom [354], Thymom [522] und im Kontrast zu normalen C-Zellen, nicht aber gegenüber normalen follikulären Zellen im medullären Schilddrüsenkarzinom [494]. Eine eindeutig stärkere Expression im Normalgewebe zeigt sich dagegen in Inselzelltumoren des Pankreas [495]. TIMP-2 wird als möglicher Marker für Differenzierung diskutiert [462]. Dementsprechend korrelieren zwar einige Studien höhere Expression mit besserer Differenzierung, z.B. im Pankreaskarzinom [146], aber der Großteil verknüpft steigende Expression mit Differenzierungsverlust, z.B. im SCLC [230] und Thymom [522], zeigt keinen Zusammenhang, z.B. im Ösophagus- [354;435] und Kolorektalkarzinom [212;414;433;497], oder widersprüchliche Ergebnisse, z.B. im Magen- [10;255] und Pankreaskarzinom [146;210]. Die Tumorgröße weist bei der überwiegenden Mehrheit der Karzinome keinen statistischen Zusammenhang mit dem Inhibitor auf [210;212;248;354]. Auch der Lymphknotenstatus ist kaum invers, z.B. in einer Studie zum Mammakarzinom [117;402;406;512;573], und ebenso selten positiv mit TIMP-2 verknüpft, z.B. inkohärent im Kolorektalkarzinom [212;219;276;385;497]. Meist kann kein Zusammenhang festgestellt werden, z.B. im Ösophagus- [354;435], Magen- [442], Merkelzell- [121], medullären Schilddrüsen- [70] und Pankreaskarzinom [210;543].

Fernmetastasierung ist, z.B. im SCLC [230] und Magenkarzinom [10], positiv mit dem Inhibitor verknüpft. Im Kolorektal- [21;212;385], Merkelzell- [121] und Pankreasadenokarzinom [543] findet sich allerdings keine Assoziation. Der Einfluss der Expression von TIMP-2 auf die Prognose in malignen Erkrankungen ist uneinheitlich und oft widersprüchlich. Ein Zusammenhang zwischen höherer Expression und kürzerem rezidivfreiem Überleben besteht beispielsweise im Ösophaguskarzinom [435] und Thymom [451]. Im Kolorektalkarzinom ist sie dagegen unerheblich für die Rezidivierung [21;433;497]. Ein Zusammenhang zwischen Gesamtüberleben und TIMP-2-Expression fehlt z.B. im Magenkarzinom [10;211;255] und häufig sind die Studien zu diesem Thema widersprüchlich, z.B. beim Pankreaskarzinom [146;210;409;543]. Jedoch identifizieren immerhin zwei Arbeiten zum Pankreaskarzinom TIMP-2 als prognostisch positiv [146;409]. Im Kolorektalkarzinom gilt TIMP-2 als unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben [414], aber diverse andere Studien konnten diesen Zusammenhang nicht bestätigen [175;212;433;474]. Somit ist der prognostische Wert der TIMP-2-Expression insgesamt fraglich.

In den Ileumkarzinoiden gehörte TIMP-2 zu den am stärksten exprimierten Parametern. Allerdings zeigte sich kein statistisch relevanter Expressionsunterschied zwischen den verschiedenen Gewebeproben. Die Expression von TIMP-2 korrelierte nicht mit der MMP-11-Expression, negativ mit den MMP-13-Werten und positiv mit den Ergebnissen der restlichen MMPs und anderen TIMPs. TIMP-2 soll die Tumorangiogenese hemmen [25;299]. Allerdings konnte keine Assoziation mit der MVD festgestellt werden. Überraschender Weise fand sich jedoch eine inverse Korrelation von TIMP-2 mit der ITL in den Ileumkarzinoiden. Die Expression des Inhibitors sank mit zunehmendem Tumordiameter und T-Stadium, sowie in hepatisch metastasierten Karzinoiden. Letztere exprimierten, im Kontrast zu den Beobachtungen in anderen Tumorentitäten, signifikant weniger TIMP-2 als Primare mit ausschließlich lymphatischer Filialisierung. Ebenso fanden sich in großen Tumoren signifikant niedrigere Expressionsraten als in kleinen Karzinoiden. Diese Ergebnisse entsprachen somit dem hemmenden Einfluss von TIMP-2 auf die Metastasierung, auf die Invasivität und das Wachstum von Tumoren [52;148;206;511]. Der Inhibitor gilt in Karzinomen als anti-proliferativ [52;511]. Jedoch konnte die Expression von TIMP-2 im Ileumkarzinoid nicht mit dem Proliferationsindex KI-67 oder dem daraus hervorgehenden Tumorgrad in Zusammenhang gebracht werden. Auch mit dem Gesamtüberleben zeigte sich hier keine statistische Verknüpfung.

TIMP-2 wird als möglicher Marker für Differenzierung diskutiert [462]. Da die Karzinoide der Studie alle als gut-differenziert eingestuft wurden, konnte dieser Aspekt leider nicht näher betrachtet werden. Allerdings gelten auch aggressive und weit fortgeschrittene Ileumkarzinoide meist als histologisch gut differenziert. So könnte der Expressionsabfall von TIMP-2 in fortgeschrittenen Tumoren dieser Studie auf einen zellmorphologisch nicht offensichtlichen Differenzierungsverlust der Karzinoide hindeuten.
Trotz der fehlenden Assoziation zum Gesamtüberleben, zeigte TIMP-2, entsprechend seiner grundsätzlich anti-kanzerogenen Wirkung [52;148;206;511], eine positive prognostische Aussagekraft bezüglich der Aggressivität von Ileumkarzinoiden. Der Inhibitor könnte somit als diagnostischer Marker, möglicherweise auch speziell für eine Entdifferenzierung, dienen.

TIMP-3 ist als einziger Vertreter seiner Familie fest in der ECM verankert [52]. Das Protein kann alle MMPs, sowie einige ADAMs und Aggrekanasen hemmen [25;459;460;511]. Abgesehen von der Bindung von Metalloproteinasen und ECM-Komponenten interagiert TIMP-3 auch mit Oberflächenrezeptoren, wie z.B. kompetitiv gegenüber VEGF-A mit VEGFR-2 und vermutlich auch mit dem Angiotensin-II-Rezeptor-2, was MMP-unabhängige Funktionsweisen eröffnet [460]. Der Inhibitor wurde zunächst als Marker für terminale Differenzierung diskutiert [148], allerdings könnte er auch entdifferenzierend wirken [460]. Generell kann TIMP-3 wahrscheinlich primär MMP-abhängig Zellproliferation einerseits anregen, andererseits hemmen [25;52;72;460]. Jedoch ist das Protein auch zu einer direkten VEGFR-2-Blockade mit konsequenter Inhibition der Endothelzellproliferation in der Lage [460]. Obwohl ein hemmender Einfluss von TIMP-3 auf die Apoptose in einem Tumorzellmodell beschrieben wurde [185], agiert der Inhibitor grundsätzlich wohl eher pro-apoptotisch [25;72;299]. Im Allgemeinen können TIMPs die Angiogenese MMP-abhängig stimulieren [206]. TIMP-3 hemmt jedoch hauptsächlich durch Stimulation der Apoptose vaskulärer glatter Muskelzellen und durch Inhibition der VEGF-induzierten Röhrenformation, der Migration und, kontrovers diskutiert, der Proliferation von Endothelzellen die Gefäßentwicklung [15;26;72;206;331;399;421]. Dies geschieht vermutlich sowohl indirekt über die Hemmung der MMPs, die stimulierend auf Endothelzellen wirken [206;353;421], als auch bei hohen TIMP-3-Spiegeln direkt durch die Blockade von VEGFR-2 [397] und möglicherweise zusätzlich durch Interaktion mit dem Angiotensin-II-Rezeptor-2 [460].

Die Rolle von TIMP-3 bei der Karzinogenese scheint nicht eindeutig. Generell wird wohl eher von einem inhibitorischen Einfluss ausgegangen [25], allerdings wurde auch TIMP-3-Überexpression im Zusammenhang mit malignen Tumoren beobachtet [7]. Es wird überwiegend von einer proliferationshemmenden Wirkung auf Tumorzellen berichtet [52;299;511]. Induktion des Tumorzellwachstums wurde allerdings ebenfalls nachgewiesen [25]. Auch die Stimulation [25;52;72;299] oder Hemmung [185] von Apoptose scheint abhängig vom jeweiligen Tumorzellmodell [460]. Die Invasivität von Tumoren wird wohl durch TIMP-3 vermindert [206;299] und die größtenteils anti-angiogene Wirkung von TIMP-3 lässt ebenfalls eine eher dämpfende Wirkung auf den Tumorprogress vermuten. Allerdings wirkt sich TIMP-3 möglicherweise negativ auf die Verbindung maligner Zellen aus und erleichtert so die Loslösung aus dem Zellverband und damit die Metastasierung [299]. Auch für TIMP-3 stellt sich die Frage, ob es primär von den Tumorzellen selbst oder vom umgebenden Gewebe exprimiert wird. Beispielsweise wird das Protein im SCLC von Tumorzellen höher exprimiert als von Stromazellen [308], jedoch im Kolorektal- [395;561] und Pankreaskarzinom [210] niedriger. Eine Studie weist in diesem Kontext daraufhin, dass eine anti-kanzerogene Wirkung mit der TIMP-3-Expression des peritumoralen Gewebes assoziiert ist [85]. TIMP-3 wird in vielen neuroendokrinen Karzinomen deutlich exprimiert, z.B. im Merkelzellkarzinom [303], SCLC [308] und Hypophysenadenom [35]. Eine spärliche Expression, wie z.B. im endokrinen Pankreaskarzinom [533], ist hingegen selten. Studien zeigen sowohl Überexpression, z.B. im Pankreasadenokarzinom [210], als auch Expressionssenkungen, z.B. im Magenkarzinom [151;229], oder auch eine Äquivalenz des Tumors zum Normalgewebe, z.B. im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus [312], Kolorektal- [21;24] und Schilddrüsenkarzinom [29]. Steigende Expressionswerte sind häufig mit einer geringeren Malignität assoziiert, z.B. im Adenokarzinom des Ösophagus [89], Magenkarzinom [228] und Hypophysentumor [35]. Es zeichnet sich kein eindeutiges Bild über den Einfluss des Inhibitors auf die Metastasierung ab, z.B. ist er positiv im Merkelzellkarzinom [121], aber negativ im endokrinen Pankreaskarzinom [533]. Der selten untersuchte Zusammenhang mit der Fernmetastasierung wird meist ausgeschlossen, z.B. im Kolorektalkarzinom [21]. Die wenigen Studien, die sich mit der Tumorgröße befassen, zeigen keine Assoziation mit TIMP-3, z.B. im Pankreasadenokarzinom [119;210]. Dagegen korrelieren T-Stadium und TIMP-3-Expression im Plattenepithelkarzinom des Ösophagus [312] und Magenkarzinom [229] invers. Der Inhibitor wird auch häufig signifikant niedriger in fortgeschrittenen

Tumorstadien exprimiert, z.B. im Kolorektalkarzinom [24;561], Adeno- [89] und Plattenepithelkarzinom des Ösophagus [312]. Zunehmende Entdifferenzierung ist im Magenkarzinom mit einer Herabregulierung von TIMP-3 assoziiert [151]. Dagegen führt eine TIMP-3-Überexpression in Kolorektalkarzinomen konträrer Weise zu schlechterer [395] bzw. besserer [24] Differenzierung und zeigt im Pankreasadenokarzinomen keine Assoziation damit [210]. Eine erhöhte TIMP-3-Expression ist in einigen Tumorentitäten ein unabhängiger prognostischer Faktor für eine gute Prognose z.B. im Rektumkarzinom [175] und hohe TIMP-3-Werte sind bei statistischer Relevanz fast durchgängig mit längerem Überleben verknüpft, z.B. im Adenokarzinom [89] und Plattenepithelkarzinom des Ösophagus [312], Magen- [151] und Kolorektalkarzinom [24;87]. Ein Zusammenhang mit dem Überleben fehlt jedoch beim SCLC [308], Pankreas- [119;210] und Merkelzellkarzinom [303].

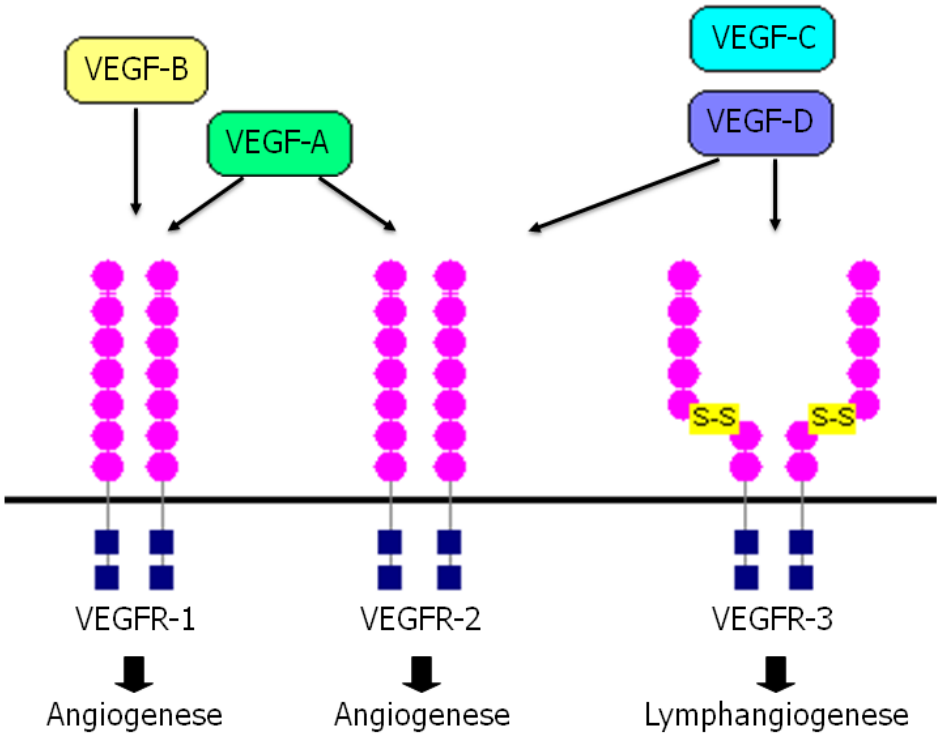
In den Karzinoiden dieser Studie wurde TIMP-3 sehr hoch und, ebenso wie in den Lymphknotenmetastasen, im Vergleich zur normalen Mukosa signifikant stärker exprimiert. Seine Expression korrelierte mit den meisten Parametern positiv, jedoch nicht mit MMP-11 und negativ mit MMP-13. TIMP-3 wirkt primär anti-angiogen [460] [397], entsprechend unerwartet war seine positive signifikante Korrelation mit der MVD im Ileumkarzinoid, die sich auch in der positiven Assoziation des Inhibitors mit den wichtigsten angiogenen Wachstumsfaktoren und Rezeptoren widerspiegelte. Die TIMP-3-Expressionswerte fielen mit zunehmender Tumorprogression ab. Die Werte zeigten aber bezüglich des T-Stadiums der Ileumkarzinoide keine eindeutige Tendenz. Dagegen wurde der Inhibitor mit steigendem Tumordurchmesser signifikant niedriger exprimiert. Dies entsprach der überwiegend proliferationshemmenden Wirkung von TIMP-3 [52;299;511]. Allerdings konnte kein Zusammenhang zwischen dem Inhibitor und dem Proliferationsindex KI-67 bzw. der hieraus resultierenden Graduierung festgestellt werden. Immerhin zeigten G2-Tumoren gegenüber G1-Tumoren eine Tendenz zu niedrigerer TIMP-3-Expression. Primare mit Fernmetastasen exprimierten signifikant weniger TIMP-3 als Tumore mit lokal begrenzter Metastasierung. Zudem war eine erhöhte Expression des Inhibitors mit einer signifikant verlängerten Gesamtüberlebenszeit der Patienten verbunden.

TIMP-3 könnte somit aufgrund der Expressionssenkung in fortgeschrittenen Tumoren und seiner Assoziation mit einem längeren Überleben als positiver prognostischer Marker für Ileumkarzinoide dienen.

4.3. Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren

Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren und die zugehörigen Rezeptoren sind unter physiologischen und vor allem unter pathologischen Bedingungen maßgeblich in die Angiogenese und Lymphangiogenese involviert [65;481]. Die humane VEGF-Familie setzt sich aus VEGF-A, -B, -C und –D zusammen und vermittelt, wie auch PlGF, ihre Wirkung über die Bindung der Rezeptoren VEGFR-1, -2 und -3, sowie Neuropilin-1 und -2 (Nrp) [125]. Dabei zeigen sich deutliche Wirkungsunterschiede zwischen den einzelnen Liganden, die auf Differenzen ihrer Affinität gegenüber den Rezeptoren, des induzierten Phosphorylisierungsmusters der Rezeptortyrosinkinasen und der Lokalisation der Rezeptoren basieren [23;439]. VEGFs sind unter anderem in der Lage Proliferation, Migration und Überleben von Zellen zu stimulieren und einen Übergang von epithelialer zu mesenchymaler Differenzierung (EMT) auszulösen [58;541]. Die VEGF-Rezeptoren werden abgesehen von Endothelzellen zusätzlich auf diversen Zelltypen und einer Vielzahl von Tumorzellen exprimiert [58]. Somit können die vaskulären Wachstumsfaktoren nicht nur mittels Angiogenese und Lymphangiogenese, sondern auch auf autokrinem bzw. parakrinem Weg Progression und Aggressivität von Karzinomen induzieren [58].

Abbildung 4.1: Schema der untersuchten VEGF-Liganden und –Rezeptoren



Es gibt bereits einige Vorarbeiten zur Angiogenese und VEGF-A-Expression in gastrointestinalen NET. Allerdings beschäftigen sich nur wenige Studien mit Ileumkarzinoiden und dies meist nur in inhomogenen Gruppen neuroendokriner Tumoren unterschiedlichen Ursprungs [262;392;488;516;570]. Zwei dieser Arbeiten untersuchen zusätzlich auch die VEGFR-1- und VEGFR-2-Expression [262;516], zu den restlichen Liganden und Rezeptoren existieren allerdings, abgesehen von einer Publikation im Rahmen der vorliegenden Studie [38], keine Daten für diese Tumorentität.

4.3.1. VEGF-Rezeptoren

VEGFRs sind transmembrane Tyrosinkinase-Rezeptoren mit einer starken Homologie zu einander [439]. Ligandenbindung induziert eine Dimerisierung, die eine intrazelluläre Phosphorylisierung und die Aktivierung von Signalkaskaden ermöglicht [64], wie z.B. dem Src-PLC-PKC-Ras-Raf-ERK/MAPK- oder dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg [58;197;394;439]. Dabei bilden sie einerseits Homodimere, andererseits scheint auch die Heterodimerisierung und Transphosphorylisierung untereinander für einige ihrer Funktionen essentiell zu sein [64;286;439;468]. Die Expression der VEGF-Rezeptoren ist teilweise durch ihre Liganden autoreguliert, aber auch Hypoxie oder AMF (autocrin motility factor) können sie unter anderem induzieren [8;366;481;545]. Durch alternatives Splicen existieren lösliche Isoformen von VEGFR-1 und -2 (sVEGFR, soluble) [439]. Sie wirken vermutlich primär antagonistisch gegenüber den membrangebundenen Isoformen, allerdings wurde bis jetzt nur sVEGFR-1 näher erforscht [58;439]. VEGF-Rezeptoren binden die Wachstumsfaktoren mit unterschiedlicher Affinität, divergieren in ihrer Tyrosinkinaseaktivität und zeigen auch Liganden-abhängige Unterschiede im Phosphorylisierungsmuster und somit ihrer Wirkung [231;419;439]. VEGFR-1 und VEGFR-2 werden regulär auf Endothelzellen von Blutgefäßen und VEGFR-3 primär auf lymphatischen Endothelzellen (LEC) exprimiert [1;81]. Allerdings kann VEGFR-2 auch auf LECs und VEGFR-3 auf Blutgefäßen pathologischer Neovaskularisation nachgewiesen werden [439;500]. Zusätzlich finden sich die Rezeptoren in einer Vielzahl nicht-endothelialer Zelltypen, was sie in diverse physiologische und pathologische Prozesse, wie zum Beispiel die Immunantwort und die Karzinogenese, involviert [58].

VEGFR-1, auch Flt-1 (fms-like tyrosine kinase) genannt [2], ist in der Lage VEGF-B [81], PlGF [375] und VEGF-A, das zu VEGFR-2 eine zehnfach geringeren Affinität besitzt, zu binden [32;94;439]. Seine Funktion ist bis heute noch nicht gänzlich entschlüsselt. Die angiogene Wirkung des Rezeptors stand aufgrund der fraglichen Tyrosinkinaseaktivität, die auf die Bindung von VEGF-A nur etwa ein Zehntel der Effektivität von VEGFR-2 zeigt, in Frage [2;309;552]. Einige Autoren halten VEGFR-1 deswegen primär für einen Köder-Rezeptor, der VEGF-A von der pro-angiogenen Bindung an VEGFR-2 abhält [58;60;64]. Knock-out-Experimente beweisen die negative regulatorische Rolle des Rezeptors bei der embryonalen Gefäßentwicklung [130;131;179]. Allerdings haben Studien eine funktionale Phosphorylierung und intrazelluläre Signalkaskaden des Rezeptors nachgewiesen [3;44;197;340;366;439;470]. Die Wirkung von VEGFR-1 divergiert in Abhängigkeit zum jeweiligen Liganden [23;178;418], dem Entwicklungsstadium des Organismus [178], der exprimierenden Zellart [81] und der Zelllokalisation [419]. Somit besitzt der Rezeptor eine multifunktionelle Rolle bei Angiogenese, Entzündungsprozessen, Tumorwachstum und Metastasierung [541]. FLT-1 wird abgesehen von Endothelzellen [51;386] in diversen Zelltypen exprimiert, wie z.B. in Monozyten, Neuronen und myeloischen Vorläuferzellen [44;58;129;439;468]. Durch alternatives Splicen entsteht eine lösliche Isoform des Rezeptors sVEGFR-1, die als anti-angiogener Köder-Rezeptor gegen VEGF-A fungiert [58;65]. Die zellgebundene Rezeptorisoform hat postnatal hingegen auf die Angiogenese eine stimulierende Wirkung, dies betrifft vor allem pathologische Prozesse, wie die Neovaskularisierung bei Ischämie und in Tumoren [23;292;324;325;445]. Aufgrund seiner begrenzten mitogenen Wirkung induziert Flt-1 das Gefäßwachstum allerdings eher über Apoptosehemmung, Chemotaxis von Endothelzellen und endothelialen Vorläuferzellen oder indirekt über Interaktion mit VEGFR-2 bzw. über die Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen [64;178;325;366;439;541;545]. Zusätzlich wirkt der Rezeptor auch auf nicht-endotheliale Zellen chemotaktisch und anti-apoptotisch [81;541;567]. Er induziert Liganden-abhängig Gefäßpermeabilität [325;439], Hämatopoese [168] und durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren indirekt Proliferation [366;530]. VEGFR-1 beeinflusst den Entzündungsprozess durch Makrophagenrekrutierung und Steigerung der Adhäsionsfähigkeiten natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) [366;530;541]. Zusätzlich kann Flt-1 den Übergang von einer epithelialen zu einer mesenchymalen Zelldifferenzierung (EMT; epithelial to mesenchymal transition) vermitteln. EMT verstärkt mesenchymale Eigenschaften wie

Migration und Invasivität von Zellen, beispielsweise in der Embryogenese aber auch in der Karzinogenese [541;546]. VEGFR-1 steht im Zusammenhang mit arteriosklerotischen, neurodegenerativen und entzündlichen Erkrankungen [44;58;292;325]. Zudem wurde sVEGFR-1 als pathophysiologische Ursache des Präeklampsiesyndroms identifiziert [65;439].

Der Rezeptor kann in diversen Karzinomen nachgewiesen werden und wird häufig auch von den Tumorzellen selbst exprimiert, z.B. im Ösophagus- [177;233], Magen- [568] und Kolorektalkarzinom [58;116;546], jedoch beispielsweise nicht von Phäochromozytomzellen [118]. Entsprechend sind autokrine Aktivierungsschleifen in verschiedenen Zellmodellen nachgewiesen worden [34;530]. Dabei zeigt sich teilweise auch eine Expressionssteigerung in Karzinomen gegenüber dem Normalgewebe, wie z.B. im Kolorektalkarzinom [163] und pulmonalen NET [427]. Auch in der Karzinogenese hat VEGFR-1 nur einen schwachen [302], in einigen Studien auch nicht nachvollziehbaren mitogenen Effekt auf Tumorzellen [116;178;530]. Ebenso ist seine anti-apoptotische Wirkung [34;541] nicht in allen Zellmodellen nachweisbar [59]. Mit Sicherheit kann der Rezeptor jedoch die Migration von Karzinomzellen induzieren [3;273;366;530;541;546]. Zudem vermittelt Flt-1 auch eine EMT von Tumorzellen. Sie findet vermutlich in einem sehr frühen Tumorstadium statt und führt zu einer erhöhten invasiven und metastatischen Potenz der Karzinomzellen [541;546]. Die direkte Assoziation des Rezeptors zur Tumorangiogenese konnte in diversen Studien bestätigt werden [178;292;325;530]. Beispielsweise ist er mit der MVD im Mammakarzinom [540] assoziiert, jedoch nicht im Hypophysenadenom [363] und Ösophaguskarzinom [233]. Flt-1 wirkt allerdings nur indirekt lymphangiogen über eine Steigerung der Gefäßpermeabilität und Rekrutierung VEGFR-1-positiver, VEGF-C und –D sezernierender Makrophagen [329]. Erhöhte Spiegel der VEGFR-1-Liganden VEGF-B [154;155;278;425] und PlGF [530] sind mit der Entstehung und Progression von Tumoren verknüpft. Der Rezeptor scheint insgesamt einen stimulierenden Einfluss auf die Malignität, das Wachstum, die Invasivität und die Metastasierung von Karzinomen zu haben [17;34;116;178;180;530;541;546]. Er wird insbesondere mit der Etablierung prämetastatischer Nischen in Verbindung gebracht [66;541]. VEGFR-1 kann dementsprechend mit der Lymphknotenmetastasierung im Magen- [523] und Kolorektalkarzinom [163] verknüpft werden. Eine Assoziation mit der Fernmetastasierung besteht beispielsweise im Magenkarzinom [523]. Ein Zusammenhang des Rezeptors mit der Tumorgröße, der im papillären

Schilddrüsenkarzinom besteht [120], fehlt aber in vielen Tumorentitäten, z.B. im Kolorektalkarzinom [163]. Eine positive Korrelation mit dem T-Stadium existiert z.B. im Magenkarzinom [523] und mit dem Tumorgrad z.B. im Kolorektalkarzinom [163]. Die Expression von Flt-4 korreliert auch in vielen Karzinomen positiv mit der Expression seines Liganden VEGF-A, z.B. im NET der Lunge [427], Ösophagus- [233] und Magenkarzinom [523]. In einigen Tumorentitäten ist eine Überexpression von VEGFR-1 mit einer verkürzten Überlebenszeit verknüpft, z.B. im Magenkarzinom [177;523]. Partiell, wie z.B. im Schilddrüsenkarzinom [120], wird der Rezeptor allerdings auch invers mit der Tumoraggressivität assoziiert.

In den untersuchten Karzinomzelllinien konnte der Rezeptor nur in den endothelialen HUVEC-CS, sowie in neuroendokrinen BON-6-Zellen nachgewiesen werden. Letzteres entsprach Ergebnissen anderer Studien, die bereits ein Vorkommen von Flt-1 in verschiedenen gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren, wie Gastrinomen, Insulinomen, G-Zell-, L-Zell-, A-Zell-Tumoren und auch in EC-Zelltumoren, publiziert haben [262;516].
In den Ileumkarzinoiden wurde VEGFR-1 deutlich, jedoch um eine Größenordnung geringer als VEGFR-2 exprimiert. Die Flt-1-Expression war in den Primärtumoren und in den Lymphknotenmetastasen signifikant höher als in der normalen Ileummukosa. Zudem konnten La Rosa et al. den Rezeptor in normalen EC-Zellen überhaupt nicht nachweisen [262]. Es könnte also von einer Überexpression oder gar de novo Expression im Rahmen der malignen Entartung der Karzinoidzellen ausgegangen werden. Im Gegensatz zu fast allen anderen Liganden und Rezeptoren der VEGF-Familie zeigte sich für VEGFR-1 hier kein Zusammenhang mit der hepatischen Metastasierung. Ebenso fiel die Expression, nur tendenziell mit steigendem T-Stadium ab. Allerdings erreichte die inverse Tendenz der VEGFR-1-Expression mit zunehmendem Tumordurchmesser zwischen Tumoren mittlerer Größe und großen Karzinoiden Signifikanz. Der Proliferationsindex KI-67, sowie der hierauf basierende Tumorgrad hatten jedoch keine Assoziation mit dem Rezeptor. Die Expression von VEGFR-1 korrelierte positiv mit der Expression der übrigen VEGF-Rezeptoren und allen VEGF-Liganden, außer VEGF-D, und verhielt sich auch entsprechend der angiogenen Rolle des Rezeptors direkt proportional zur MVD. Dies widersprach allerdings Ergebnissen einer anderen Studie, die sich unter anderem mit gastrointestinalen EC-Zelltumoren befasst [262]. Dagegen zeigte die Lymphgefäßdichte in den

Ileumkarzinoiden dieser Arbeit keinerlei Assoziation mit dem Rezeptor. Ebenso ergab sich keine Auswirkung der VEGFR-1-Expression auf die Überlebenszeit der Patienten.

Zusammenfassend konnte die Expression von VEGFR-1 in Ileumkarzinoiden mit der Angiogenese verknüpft werden und schien tendenziell mit einer zunehmenden Tumoraggressivität invers verbunden zu sein. Dieser Trend erreichte hier aber kaum Signifikanz. Allerdings war es auch einer anderen Studie nicht möglich, den Rezeptor signifikant mit der Malignität gastrointestinaler EC-Zelltumore zu assoziieren [262]. Die Überexpression in den Karzinoiden im Vergleich zu normalen EC-Zellen, könnte entsprechend der These von La Rosa et al. [262] jedoch auf eine autokrine bzw. parakrine Rolle des Rezeptors in der frühen Tumorentstehung, vielleicht auch im Rahmen einer EMT, hinweisen. Ein Einfluss auf die spätere Tumorprogression erscheint dagegen unwahrscheinlich.

VEGFR-2, alias humanes KDR (kinase insert domain containing receptor) bzw. murines Flk-1 (fetal liver kinase 1) [2;58;366], besitzt trotz seiner starken Homologie gegenüber VEGFR-1 eine divergierende Wirkungsweise und eine zehnfach stärkere Kinase-Effektivität [439;552]. Knock-out-Experimente offenbaren seine essentielle Funktion in der embryonalen Vaskulogenese bzw. Angiogenese und Hämatopoese [1;250]. Der Rezeptor wird hauptsächlich auf Blutgefäßendothelzellen exprimiert [2;481], ist aber auch in lymphatischen Endothelzellen [186;500], hämatologischen Stammzellen, Fibroblasten, neuronalen Zellen, Osteoblasten und vielen anderen Zelltypen nachweisbar [1;58;439]. VEGF-A und die prozessierten Formen von VEGF-C und VEGF-D können durch Bindung an VEGFR-2 seine Dimerisierung und Aktivierung induzieren [1;4;215;366;413;419;481]. Der aktivierte Rezeptor ist in der Lage Genexpression zu modulieren und wirkt mitogen, anti-apoptotisch und chemotaktisch [58;124;341;439]. Dadurch vermittelt er Proliferation, Migration, Überleben und Röhrenformation von Endothelzellen und ist der primäre Mediator der Angiogenese [2;250;309;413]. KDR induziert zudem Gefäßpermeabilität, Vasodilatation und Hämatopoese [122;413]. Durch seine Expression auf LECs wirkt er auch schwach lymphangiogen [186;205;286;336]. VEGFR-2 beeinflusst zusätzlich die Immunantwort [64;123] und wirkt möglicherweise neuroprotektiv [207;439;465]. Dabei sind seine Funktionen allerdings aufgrund von Unterschieden in der Tyrosinphosphorylisierung stark Liganden-abhängig [231;366]. Die VEGFR-2-Signalgebung wird primär durch

VEGF-A induziert, obwohl die Affinität zu diesem Liganden um eine Größenordnung geringer ist als bei Flt-1 [58;309;552]. VEGF-C und –D stimuliert zwar ebenfalls Angiogenese und Gefäßpermeabilität, jedoch mit einer geringeren Effektivität [61;215;231;250;413]. Die Expression von VEGFR-2 auf Endothelzellen wird unter pathologischen Bedingungen hochreguliert, wie z.B. bei der diabetischen Retinopathie, rheumatischen Arthritis und auch der Tumorangiogenese [182;366;438;439].

Der Rezeptor unterstützt in der Karzinogenese nicht nur den angiogenen „Switch“ [69], sondern auch die Tumorlymphangiogenese [176]. Er ist in Karzinomen häufig auf Endothelzellen zu finden, z.B. in Hypophysenadenomen [363], Inselzelltumoren [79], endokrinen Pankreas- [164], Kolorektal- [102;356] und Pankreasadenokarzinomen [55;514]. Dementsprechend zeigt VEGFR-2 z.B. im Kolorektalkarzinom [165] und teilweise im Magenkarzinom [477;485] eine direkte Assoziation mit der MVD; dagegen besteht im Ösophaguskarzinom kein Zusammenhang [233]. Seine Expression korreliert z.B. im Hypophysenadenom [347], Phäochromozytom [480], Ösophagus- [233] und Nebenschilddrüsenkarzinom [268] mit der Expression seines Hauptliganden VEGF-A, jedoch nicht im Magen- [485] und Pankreasadenokarzinom [80]. Zudem besteht im Kolorektalkarzinom eine Assoziation mit der VEGF-C- [102], sowie im Ösophagus- [233] und Pankreasadenokarzinom [80] mit der VEGFR-1-Expression. Eine Überexpression des Rezeptors im Vergleich zum Normalgewebe existiert z.B. im Pankreasadenokarzinom [514], Hypophysenadenom [306], Phäochromozytom [480], sowie in einem Teil der Studien zum Kolorektal- [144;163;376] und Schilddrüsenkarzinom [56;202], jedoch nicht in Inselzelltumoren [79]. VEGFR-2 wird auch in verschiedenen neuroendokrinen Tumorentitäten exprimiert, wie z.B. im Nebenschilddrüsenkarzinom [268], Phäochromozytom [480], Hypophysenadenom [306;347], sowie in den Tumorzellen des SCLC [486], neuroendokriner Pankreaskarzinome [164], diverser NET des Magens und Darms, sowie der EC-Zelltumoren des Ileums, Kolons und der Appendix [262]. Zudem kann KDR in diversen Tumorzellen selbst nachgewiesen werden, wie z.B. im Schilddrüsen- [56], Kolorektal- [102], Ösophagus- [233] und Pankreasadenokarzinom [55;514]. Somit wird zusätzlich eine autokrine Wirkung des Rezeptors ermöglicht [98;486;514;528]. Dementsprechend kann VEGFR-2 durch mitogene und anti-apoptotische Effekte das Wachstum und die Migration von malignen Zellen stimulieren und dadurch die Invasivität und Metastasierung von Karzinomen induzieren [58;98;122;123;302;439;467;486].

Zusätzlich ermöglicht KDR den Tumorzellen vermutlich die Umgehung der Immunantwort [123]. VEGFR-2 korreliert im Phäochromozytom direkt mit der Malignität [118], allerdings nicht im Kolorektal- [163] und Schilddrüsenkarzinom [202]. KDR ist z.B. in Inselzelltumoren [69], sowie teilweise in Schilddrüsenkarzinomen [56;508], jedoch nicht in kolorektalen Karzinomen [163] mit der Tumorgröße verknüpft. Im Kontrast zu seiner Fähigkeit Migration und Proliferation zu induzieren [58;122], ist VEGFR-2 kaum mit der Invasionstiefe von Tumoren assoziiert, so z.B. auch nicht im Kolorektal- [163] und Schilddrüsenkarzinom [508]. Ebenso korreliert der Rezeptor nicht mit dem Tumorgrad im Kolorektalkarzinom [163], dafür mit einer schlechteren Differenzierung im Pankreasadenokarzinom [55]. Entsprechend seiner Wirkungsweise ist VEGFR-2 mit der Entstehung von Lymphknotenmetastasen z.B. im Kolorektal- [163] und teilweise im Ösophaguskarzinom [233;285] assoziiert, allerdings nicht im Schilddrüsenkarzinom [56]. Die Fernmetastasierung ist dagegen im Schilddrüsenkarzinom zumindest partiell mit dem Rezeptor korreliert [56;508]. Im Kolorektalkarzinom zeigen sich unter diesem Aspekt widersprüchlich sowohl positive [478] als auch inverse Verknüpfungen [446]. Auch ein Zusammenhang der KDR-Expression mit dem Tumorstadium ist selten. Er besteht z.B. im intestinalen Magenkarzinom [477], jedoch nicht im Kolorektal- [163], Ösophagus- [233], Schilddrüsen- [508] oder Pankreasadenokarzinom [80]. Eine Überexpression von VEGFR-2 wirkt sich jeweils zumindest in einer Studie zum Kolorektal- [165;356], Magen- [177;368] und Pankreasadenokarzinom [55;80] negativ auf die Überlebenszeit der Patienten aus.

VEGFR-2 konnte in epithelialen HUVEC-Zellen auf einem sehr hohen Niveau nachgewiesen werden, aber auch die neuroendokrine BON-6-Zelllinie exprimierte den Rezeptor, vergleichbar mit einer anderen Arbeit über endokrine Tumore aus Magen, Darm und Pankreas [262], deutlich.

In den Karzinoiden des terminalen Ileums wurde VEGFR-2 entsprechend einer Studie mit EC-Zellkarzinoiden des Ileums, Kolons und der Appendix [262] sehr stark exprimiert. Dabei waren die Werte im Vergleich zur normalen Ileummukosa in den Primaren signifikant erhöht. Aufgrund des Fehlens einer KDR-Expression in normalen EC-Zellen und der Lokalisierung des Rezeptors in sowohl Endothel- als auch Karzinoidzellen [262] kann für die Ileumkarzinoide von einer Überexpression im Rahmen der Karzinogenese ausgegangen werden. Zudem konnte die VEGFR-2-Expression hier im Gegensatz zu La

Rosa et al. [262] mit der MVD und somit mit der Angiogenese assoziiert werden. Dies entsprach auch der positiven Korrelation mit den Expressionswerten der restlichen Rezeptoren und der VEGFs, außer VEGF-D. Allerdings war, bei fehlender Assoziation mit der PTL, die überraschend inverse Korrelation mit der ITL unerklärlich. La Rose et al. können die KDR-Expression in EC-Zellkarzinoiden nicht mit der Malignität der Tumore korrelieren [262]. Im Kontrast dazu waren in der vorliegenden Arbeit niedrigere Expressionswerte signifikant mit einer hepatischen Filialisierung und einem großen Durchmesser der Ileumkarzinoide assoziiert. Es zeigte sich auch eine zwischen T1 und T4 signifikante Tendenz zu fallenden Expressionsniveaus bei steigendem T-Stadium. Allerdings waren der KI-67-Index und der Tumorgrad nicht mit VEGFR-2 verknüpft. Ileumkarzinoide mit geringerem VEGFR-2-Spiegel waren tendenziell mit einer kürzeren Überlebenszeit der Patienten verbunden, allerdings erreichte dieser Zusammenhang keine Signifikanz (P = 0,089).

Zusammenfassend konnte diese Studie die Überexpression von VEGFR-2 in Ileumkarzinoiden bestätigen und im Gegensatz zu La Rosa et al. [262] mit der Tumorvaskularisierung und -aggressivität assoziieren. Allerdings lässt die inverse Korrelation mit dem Tumorprogress auf eine Induktion im frühen Stadium der Karzinogenese schließen und weist somit auf eine Rolle in der Karzinoidentstehung hin. Die fallenden Expressionswerte könnten dabei entsprechend der Theorie von Poncet et al., die das angiogene Potential direkt mit der Differenzierung von endokrinen Tumoren assoziiert [392], für einen Entdifferenzierungsprozess der Ileumkarzinoide sprechen.

Das Glykoprotein **VEGFR-3**, auch Flt-4 (fms-like tyrosine kinase) genannt, unterschiedet sich von den übrigen vaskulären Rezeptor-Tyrosinkinasen im Aufbau durch eine gespaltene und durch eine Disulfidbindung verknüpfte sechste extrazelluläre Immunglobulin-homologe Domäne [58;418]. VEGF-C und VEGF-D sind sowohl in vollständiger Länge, als auch in prozessierter Form Liganden von VEGFR-3 und führen zu seiner Phosphorylierung [1;58;413;505]. Eine Interaktion mit VEGFR-2 durch Heterodimerisierung scheint für einen Teil der biologischen Funktionen von VEGFR-3 obligatorisch [286]. In der Embryogenese ist der Rezeptor zunächst entscheidend in die kardiovaskuläre und später in die lymphatische Entwicklung involviert [1;357;383;496]. Wobei allerdings ein VEGFR-3-Knock-out zu dem identischen Phänotyp wie bei einer

Maus mit einem gleichzeitigen Knock-out von VEGF-C und VEGF-D führt, die normale Blutgefäße aufweist. Dies könnte auf einen weiteren Liganden oder auf eine VEGFR-3-VEGFR-2-Kooperation hinweisen [160]. Die Aktivierung des Rezeptors hemmt die Apoptose von Zellen [8;297;468] und steigert ihre Proliferation [205;286;297;500]. Zudem wird eine Reorganisation von Aktinfilamenten und damit die Migration von Zellen induziert [8;286;468]. VEGFR-3 wird im adulten Gewebe hauptsächlich auf lymphatischen Endothelzellen (LEC) exprimiert [1;58;468] und vermittelt somit primär Lymphangiogenese [413;500]. Allerdings ist Flt-4 auch bei Monozyten [439], Cornea-Epithel [88] und auf gefensterten Kapillaren diverser Organe, wie z.B. in Sinusoiden der Milz und Leber oder in endokrinen Drüsen nachzuweisen [378]. Zusätzlich findet sich der Rezeptor bei Neovaskularisierung auch in großer Zahl auf Blutgefäßendothel, z.B. in Tumoren oder chronisch entzündlichen Wunden [377], und besitzt somit angiogene Potenz [468;482]. Möglicherweise wird seine Expression in proliferierenden Gefäßen induziert und ist in ausgereiften Gefäßen redundant [366;482]. Zusätzlich wirkt VEGFR-3 als Köder-Rezeptor auf nicht-endothelialen Zellen anti-angiogen [88] und kontroverser Weise apoptotisch auf Makrophagen [430]. Bei entzündlichen Erkrankungen, wie z.B. Arthritis und Psoriasis, sowie bei Hyperthyroidismus und Arteriosklerose lässt sich eine Flt-4-Überexpression feststellen [58;439].

Trotz häufiger Korrelation der VEGFR-3-Expression mit der Progression verschiedener Karzinomtypen ist die Funktion des Rezeptors in der Karzinogenese größtenteils unklar [366;469]. Flt-4 wird in und um Tumoren auf Lymphgefäßen exprimiert [205] und scheint somit in deren Lymphangiogenese involviert [263;366;383;439;455]. Dennoch ist die Regulation der Tumorlymphangiogenese immer noch kaum verstanden und es gibt kaum Hinweise darauf, dass Lymphgefäße durch VEGF-C/D zur Proliferation innerhalb des Tumorgewebes stimuliert werden [439]. Da VEGFR-3 allerdings häufig auf Blutgefäßendothel in Karzinomen nachzuweisen ist [377], scheint der Rezeptor auch in der Angiogenese von Tumoren eine Rolle zu spielen [263;439]. Damit lässt sich auch erklären, dass eine Korrelation von Flt-4 mit der Lymphgefäßdichte, wie sie z.B. im Magenkarzinom [220] besteht, nicht immer nachzuweisen ist, z.B. im duktalen Mammakarzinom [47] und VEGFR-3 auch mit der Blutgefäßdichte durchaus assoziiert sein kann, z.B. im Kolorektalkarzinom [531], aber nicht muss, z.B. im Magenkarzinom [220].

Zusätzlich wird VEGFR-3 von vielen Tumorzellen selbst exprimiert, z.B. im SCLC [486], Kolorektal- und neuroendokrinen Pankreaskarzinom [164]. Der Rezeptor kann somit direkt anti-apoptotisch [430;469], migrationssteigernd [468;486] und teilweise proliferativ [469;486] auf Karzinomzellen wirken. Flt-4 steigert also die Invasivität von Tumoren [468], vermittelt allerdings eher Metastasierung als Wachstum [469]. Wobei die Entstehung von Lymphknotenmetastasen viel eindeutiger mit VEGFR-3 verknüpft ist [439;468;473], als die Fernmetastasierung [468;473]. Der Rezeptor ist in vielen Karzinomen höher exprimiert als im korrespondierenden Normalgewebe, z.B. im Magen- [14;77;220;441], Schilddrüsen- [56] und duktalen Pankreaskarzinom [517]. Dagegen weisen Studien widersprüchlich auf eine gesteigerte [376;468;531], gleichbleibende [17] oder geminderte [163] Expression im Kolorektalkarzinom gegenüber normaler Mukosa, sowie auf eine positive [531] bzw. eine negative [163] Korrelation mit zunehmender Malignität hin. Die Expression von VEGFR-3 korreliert mit der Expression seiner Liganden VEGF-C und VEGF-D im Magenkarzinom [77;441;553], aber nicht mit der VEGF-D-Expression im Kolorektalkarzinom [531]. Mit der Tumorgröße ist Flt-4 im Magenkarzinom assoziiert [77], jedoch nicht im Kolorektal- [163] oder Schilddrüsenkarzinom [56]. Ebenso zeigt sich sowohl im Magen- [77;220;441] als auch im Kolorektalkarzinom [163;531] keine Verknüpfung des Rezeptors mit dem T-Stadium, dem Tumorgrad oder der Differenzierung. Eine Korrelation von VEGFR-3 mit der Lymphknotenmetastasierung besteht für das Magenkarzinom nur partiell [77;220;441;553], im Kolorektal- [163] und Schilddrüsenkarzinom [56] dagegen nicht. Zudem scheint die Expression von Flt-4 keinen Einfluss auf die Entstehung von Fernmetastasen im Schilddrüsen- [56] und Magenkarzinom [77;441] zu haben. VEGFR-3 ist im Magenkarzinom mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben verknüpft [77;220], dagegen ist seine Assoziation mit einem kürzeren Gesamtüberleben nicht eindeutig [77;177;220;441].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich parallel zur Literatur in endothelialen HUVEC-Zellen eine Flt-4-Expression, jedoch keine in den gastrischen AGS- und KATOIII-Zelllinien [220]. Auch in den neuroendokrinen BON-6-Zellen konnte VEGFR-3 entsprechend zu Ergebnissen im NET des Pankreas [164] nachgewiesen werden.

In den Ileumkarzinoiden wurde VEGFR-3 auf niedrigem Niveau aber deutlich exprimiert, dabei zeigte sich allerdings kein Unterschied zwischen malignem und benignem Gewebe. Das Expressionsniveau korrelierte positiv mit VEGF-A, -B und –C, VEGFR-1 und -2, jedoch wie auch im Kolorektalkarzinom [531], nicht mit VEGF-D. VEGFR-3 zeigte eine positive Korrelation mit der MVD, jedoch keine mit der ITL oder PTL. Diese Ergebnisse entsprachen der bekannten VEGFR-3-Expression auf Tumorgefäßen [377] und stimmten mit Beobachtungen in anderen Tumorentitäten überein [47;531]. Angesichts der gegenüber den Blutgefäßen sehr geringen Lymphgefäßanzahl ist eine mögliche Assoziation von VEGFR-3 mit der Lymphangiogenese in Ileumkarzinoiden nicht auszuschließen. Hinsichtlich der Histopathologie zeigte Flt-4 in den EC-Zellkarzinoiden keinen Zusammenhang mit dem T-Stadium, dem Proliferationsindex KI-67 bzw. dem Tumorgrad. Allerdings sank die Expression des Rezeptors signifikant in hepatisch metastasierten, sowie auch in großen Primärtumoren. Eine Assoziation zur Überlebenszeit der Patienten ergab sich für Flt-4 nicht.

Der Expressionsverlust von VEGFR-3 im Verlauf zunehmender Progression der Karzinoide widersprach der generell eher pro-kanzerogenen Wirkung des Rezeptors [366]. Ebenfalls fand sich hier kontroverser Weise kein Zusammenhang mit der Lymphgefäßdichte in den Tumoren. Allerdings könnte Flt-4 in Ileumkarzinoiden mit der Angiogenese assoziiert sein und als positiver prognostischer Faktor bezüglich der Aggressivität der EC-Zelltumore dienen.

4.3.2. VEGF-Liganden

Die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren sind dimerisierte Glykoproteine mit einer starken Homologie zu einander [481], aber deutlichen Unterschieden in ihrer Wirkung und Expression [264;324], die aufgrund ihrer divergierenden Rezeptoraffinität in drei Gruppen eingeteilt werden können (siehe auch Abbildung 4.1, Seite 116) [60]. VEGF-A, der potenteste Mediator von Angiogenese und Gefäßpermeabilität, vermittelt seine Aktivität über VEGFR-1 und vor allem über VEGFR-2, sowie mittels Nrp-1 und -2 [295]. VEGF-B dient dagegen, wie auch PlGF, nur als Ligand von VEGFR-1 und Nrp-1 [296;359]. VEGF-C und VEGF-D sind in der Lage an VEGFR-3, Nrp-1, Nrp-2 und in prozessierter Form ebenfalls an VEGFR-2 zu binden und induzieren primär Lymphangiogenese [418]. VEGFs werden auf verschiedenen Ebenen reguliert und ihre Expression kann durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und teilweise auch durch Hypoxie induziert werden [366;419;552]. Die Dimere besitzen unter anderem mitogene, chemotaktische und anti-apoptotische Potenz und können ihre Funktion durch Heterodimerisierung untereinander modulieren [58;360]. Allerdings zeigen sie an denselben Rezeptoren teilweise deutliche Unterschiede in ihrer Wirkung. Dies gilt beispielsweise für VEGF-A und VEGF-B an VEGFR-1 [445], für VEGF-A und VEGF-C bzw. VEGF-D an VEGFR-2 [61;231], innerhalb der Subfamilie VEGF-C und VEGF-D [251] und selbst für verschiedene Isoformen von VEGF-A [419].

VEGF-A wurde bereits 1983 als VPF (vascular permeability factor) identifiziert und ist das potenteste Stimulans für Gefäßpermeabilität und Angiogenese [366;419]. In der Embryonalphase ist es essentiell für die Hämatopoese und Entstehung des Gefäßnetzes [58;250]. Als Ligand der Rezeptoren VEGFR-1, VEGFR-2, Nrp-1 und Nrp-2 wirkt VEGF-A mitogen, anti-apoptotisch, sowie chemotaktisch auf Zellen, beeinflusst ihre Genexpression und kann eine EMT induzieren [58;64;122;295;541]. Obwohl VEGFR-1 eine zehnfach höhere Affinität zu dem Wachstumsfaktor aufweist, dient VEGFR-2 als sein Hauptmediator, da dessen Tyrosinkinaseaktivität bei VEGF-A-Bindung um eine Größenordnung stärker ist [58]. Flt-1 wirkt deswegen teilweise, ebenso wie die löslichen Isoformen der Rezeptoren, als Köder-Rezeptor hemmend bzw. dämpfend auf die Aktivität des Liganden, scheint aber, vor allem unter pathologischen Bedingungen, auch direkt funktional zu sein [2;65]. Durch die Expression von VEGFR-1

und vor allem VEGFR-2 auf Blutgefäßendothel ist VEGF-A in der Lage Proliferation, Migration, Invasion, Überleben, Aussprossung und Röhrenformation von Endothelzellen und somit Angiogenese zu stimulieren [1;81;419;439;481]. Zudem vermittelt das Dimer Vasodilatation und über Rekrutierung von Progenitorzellen Vaskulogenese und Hämatopoese [122;366]. Zusätzlich besitzt der Wachstumsfaktor über den auch auf LECs exprimierten VEGFR-2 eine direkte und über VEGFR-1-präsentierende Monozyten eine indirekte lymphangiogene Potenz, die allerdings nur schwach ausgeprägt, eher zu einer Hyperplasie der Lymphgefäße führt [186;205;286;336;500]. VEGF-A moduliert zudem die Immunantwort [122;123;222;481], wirkt neuroprotektiv und stimuliert das Knochenwachstum [44;195;207;366;439].
Die Aktivität von VEGF-A wird auf vielfältige Weise reguliert [58;264]. Beispielsweise wird der Wachstumsfaktor im Extrazellularraum durch Abspaltung des hemmenden CTGF mittels Proteasen, wie den MMPs, aktiviert [399;419;511]. Durch alternatives Splicen existieren neun Isoformen des Liganden, die sich anhand ihrer Löslichkeit und Bindungsfähigkeit unterscheiden [58;419]. So kommt es zu unterschiedlicher Rezeptorphosphorylierung, was beispielsweise zu Varianten der Gefäßmorphologie, aber auch zur Inhibition der Angiogenese führen kann [419]. In dieser Arbeit wurde allerdings der Pimer/Probe-Satz so entworfen, dass alle VEGF-A-Isoformen detektiert wurden.

Im ausgewachsenen Organismus ist die VEGF-A-Aktivität größtenteils auf die Wundheilung und den weiblichen Reproduktionszyklus beschränkt [58]. Allerdings ist er in diverse Krankheiten involviert, wie z.B. die Arthritis oder neurodegenerative Erkrankungen [182;465]. VEGF-A ist ebenfalls der Hauptmediator pathologischer Neovaskularisierung im Auge und intra-okuläre Applikation der VEGF-A-Inhibitoren, Pegaptanib (Macugen™; OSI/Pfizer), Ranibizumab (Lucentis™, Genentech) und off-label auch Bevacizumab (Avastin™; Roche), zeigt sowohl bei der diabetischen Retinopathie, als auch bei der altersassoziierten Makuladegeneration große therapeutische Erfolge [19;122;190;295;335].

VEGF-A kann in einer Vielzahl von Tumorentitäten nachgewiesen werden, z.B. im Magen- [191;253], Ösophagus- [424] und Nebenschilddrüsenkarzinom [268] und wird häufig gegenüber dem Normalgewebe überexprimert z.B. im Hypophysenadenom [306], Phäochromozytom [480], Pankreasadeno- [196;514] und Kolorektalkarzinom [28;362].

Diese dysregulierte Expression löst über endothelial exprimierte VEGF-Rezeptoren den angiogenen „Switch“ und somit Tumorangiogenese aus, die zu einem chaotischen, undichten Gefäßnetz führt [58;122;421;439;496]. Entsprechend verhält sich die VEGF-A-Expression häufig zur MVD proportional, z.B. im Kolorektal- [165;559] und Magenkarzinom [213;277;290;571;574], sowie meist im Ösophagus- [194;233;285] und Pankreasadenokarzinom [192;282;343]. VEGFR-2 wird auch von LECs und VEGFR-1 von Makrophagen exprimiert, dadurch kann VEGF-A Tumorlymphangiogenese induzieren [1;40;176]. Eine Assoziation des Liganden mit der LVD zeigt sich beispielsweise im Ösophagus- [194], jedoch nicht im Magenkarzinom [521].

Viele Tumorzellen sind in der Lage VEGF-A zu produzieren, z.B. im SCLC [486], Kolorektal- [144;163], Schilddrüsen- [275], Magen- [284;345] und Pankreasadenokarzinom [55;196]. Da auch die VEGF-Rezeptoren häufig von den malignen Zellen selbst exprimiert werden, z.B. im Magen- [568], Schilddrüsen- [56], Ösophagus- [233] und Pankreasadenokarzinom [514;546], ist eine autokrine Wirkungsweise des Wachstumsfaktors möglich [341]. Somit kann VEGF-A die Migration, Proliferation, das Überleben und EMT von malignen Zellen stimulieren [58;123;302;541]. Der Wachstumsfaktor vermittelt zudem auch eine Umgehung der Immunantwort und eine Chemoresistenz der Tumorzellen [58;122]. Der Ligand ist somit in der Lage Tumorprogression mit erhöhtem Wachstum, verstärkter Invasivität, Metastasierung, Malignität und konsekutiv eine Verkürzung der Überlebenszeit zu bewirken [58;122;468;541]. Eine Expressionszunahme mit steigender Malignität zeigt sich z.B. im Phäochromozytom [118], Magen- [575], Schilddrüsen- [93;120] und teilweise im Kolorektalkarzinom [144;163;362], jedoch nicht im Nebenschilddrüsenkarzinom [142]. VEGF-A vermittelt Wachstum und kann somit mit der Tumorgröße assoziiert sein, wie z.B. in einem Teil der Studien zum Kolorektal- [28;163;362], Magen- [227;253;525;574] und Pankreasadenokarzinom [196;282]. Mit dem Proliferationsindex KI-67 korreliert der Ligand dagegen positiv im Schilddrüsen- [240] und invers im Magenkarzinom [193]. Die invasive Wirkung des Wachstumsfaktors zeigt sich an seiner Assoziation mit dem T-Stadium [58], z.B. im Pankreas- [214] und Ösophagusadenokarzinom [518], sowie uneinheitlich im Kolorektal- [163;559] und Magenkarzinom [227;253;277;290;523;575], dagegen nicht im Schilddrüsenkarzinom [188;508]. Der Ligand besitzt auch einen pro-metastatischen Effekt [58] und ist z.B. im Pankreasadenokarzinom [18;196] mit der Lymphknotenmetastasierung verknüpft, dagegen nur partiell im Kolorektal-

[144;163;234;559], Magen- [191;227;345;525;571], Ösophagus- [233;285;424] und Schilddrüsenkarzinom [56;93;492]. Zusätzlich ist die Existenz von Fernmetastasen z.B. im Kolorektal- [234] und Magenkarzinom [213;277;290], jedoch nicht im Schilddrüsenkarzinom [56;508], mit der Überexpression des Wachstumsfaktors assoziiert. VEGF-A gilt als negativer prognostischer Faktor [58;123]. Seine Expression ist, z.B. im SCLC [564], Kolorektal- [97] Ösophagus- [424], häufig im Magen- [191;193;277;290;368;485] und teilweise im Pankreasadenokarzinom [80;192;196;282;343], mit einem kürzeren Gesamtüberleben verknüpft.

Es existieren bereits einige Vorarbeiten über die VEGF-A-Expression in gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren. Die meisten Publikationen befassen sich mit endokrinen Pankreaskarzinomen [79;84;164;300;447;476] und einige Studien zumindest partiell mit Karzinoiden des Darms [262;379;392;488;516;570]. Dabei zeigt sich eine deutliche Expression des Liganden in den Tumoren und auch in den Tumorzellen selbst z.B. in endokrinen Pankreaskarzinomen [164], NET des Vorder- und Mitteldarms [516] und EC-Zellkarzinoiden des Ileums, Kolons und der Appendix [262]. Diese Werte sind im Vergleich zu denjenigen im entsprechenden Normalgewebe, z.B. beim NET des Pankreas [79] und Darms [262], auch signifikant gesteigert. Auch in den Ileumkarzinoiden der vorliegenden Arbeit wurde VEGF-A stark exprimiert. Es zeigten sich dabei keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen malignem Gewebe und normaler Ileummukosa. Dennoch kann im Zusammenhang mit dem Nachweis einer VEGF-A-Absenz in normalen EC-Zellen durch La Rosa et al. [262] von einer Überexpression in den Karzinoiden ausgegangen werden. Der angiogene Faktor korrelierte in den untersuchten Ileumkarzinoiden, wie auch in weiteren Studien zu gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren [392;570], positiv mit der MVD. In anderen Arbeiten zum pankreatischen NET [300;476] und zu EC-Zellkarzinoiden des Darms [262] kann dieser Zusammenhang jedoch nicht nachvollzogen werden. Ergebnissen im endokrinen Pankreaskarzinom [447] entsprechend war weder die ITL noch die PTL mit der VEGF-A-Expression in den Ileumkarzinoiden assoziiert. VEGFR-1 und VEGFR-2 können in gastrointestinalen neuroendokrinen Tumorzellen [164;499;516], insbesondere in solchen mit EC-Zellursprung [262], nachgewiesen werden. Auch in den Ileumkarzinoiden dieser Arbeit zeigten sich deutliche Rezeptorexpressionen, die zudem mit der VEGF-A-Expression korrelierten. Somit besteht die Möglichkeit autokriner Effekte des Wachstumsfaktors. Überraschenderweise korreliert VEGF-A in

gastrointestinalen NET oft invers mit der Malignität [84;392] und Invasivität der Tumore [392], eine Tendenz, die ebenfalls anhand des T-Stadiums in den untersuchten Ileumkarzinoiden festgestellt werden konnte. Signifikant war hingegen der Expressionsverlust in großen Primaren gegenüber Karzinoiden kleinen oder mittleren Durchmessers. Diese Verknüpfung zeigt sich jedoch nicht in einer anderen Studie mit EC-Zellkarzinoiden des Darms [262] und im Kontrast dazu korreliert die Tumorgröße im endokrinen Pankreaskarzinom sogar positiv mit dem Liganden [476]. Der Proliferationsindex KI-67 konnte in den Ileumkarzinoiden, wie auch im endokrinen Pankreaskarzinom [476], nicht mit dem Wachstumsfaktor assoziiert werden. Eine Publikation über gastrointestinale NET verschiedenen Ursprungs zeigt eine positive Assoziation des Wachstumsfaktors mit sowohl der Lymphknoten- als auch der Fernmetastasierung [570] Andere Arbeiten zum pankreatischen NET [476] bzw. zu EC-Zellkarzinoiden des Darms [262] schließen dies jedoch aus. Eine Studie mit neuroendokrinen Zelllinien stellt sogar einen inversen Zusammenhang zwischen VEGF-A-Expression und der Entstehung von Fernmetastasen fest [392]. Ebenso waren auch in der vorliegenden Arbeit die Expressionswerte in Ileumkarzinoiden mit Fernmetastasen signifikant niedriger als in Primaren mit ausschließlich regionaler Metastasierung. Eine Korrelation mit der Überlebenszeit der Patienten ergab sich hier nicht. Allerdings zeigen Zhang et al. einen negativen Einfluss stärkerer VEGF-A-Expression auf die Überlebenszeit mit gut differenzierten, gastrointestinalen NET und schließt daraus auf eine entscheidende Rolle des VEGF-A-Signalweges in der Tumorangiogenese, Karzinogenese und Progression sowie einen möglichen negativ prognostischen Wert des Liganden in dieser Tumorentität [570].

Im Kontrast dazu lassen die starke Expression, die angiogene Verknüpfung und die Herunterregulation in fortgeschrittenen Primaren in der vorliegenden Arbeit, wie auch schon von La Rosa et al. [262] angeregt, auf eine Rolle des Wachstumsfaktors in der Tumorgenese und weniger auf einen stimulierenden Einfluss auf die Aggressivität und Progression der Ileumkarzinoide schließen. Möglicherweise könnte VEGF-A entsprechend der These von Poncet et al. [392] auch als Parameter für eine gute Differenzierung von EC-Zellkarzinoiden und somit als positiver prognostischer Faktor bezüglich ihrer Malignität dienen.

VEGF-B ähnelt strukturell VEGF-A, mit dem es teilweise auch dimerisiert, unterscheidet sich aber deutlich in seiner Wirkung [360;481;552]. Durch alternatives Splicen entstehen zwei Isoformen des Glykoproteins: das dominante VEGF-B-167 und das freilösliche, vor allem in Tumoren exprimierte VEGF-B-186 [278;361;419]. In dieser Arbeit wurden allerdings beide Varianten detektiert. VEGF-B bindet spezifisch an Neuropilin-1 und VEGFR-1 [296;359]. VEGFR-1 galt jedoch lange ausschließlich als Köder-Rezeptor mit mangelnder Tyrosinkinaseaktivität, dementsprechend umstritten war auch die Wirkungsweise von VEGF-B [60;359]. Allerdings konnte mittlerweile die funktionale Signalgebung des Rezeptors nachgewiesen werden, deren Ausprägung und Wirkung abhängig vom jeweiligen Liganden divergiert [23;44;325;340;418;470]. Obwohl VEGF-B in den meisten Gewebearten exprimiert wird [109;264;360;425], zeigen Knock-out-Experimente, dass der Wachstumsfaktor für die normale Entwicklung und Aufrechterhaltung des Gefäßsystems entbehrlich ist [2;36]. Diverse Autoren sprachen VEGF-B eine angiogene Potenz ab [39;404;413] bzw. erklärten sie ausschließlich über die Verdrängung von VEGF-A aus der nicht-funktionalen Bindung mit VEGFR-1 [359]. Inzwischen wurde allerdings eine aktive angiogene Wirkung von VEGF-B bewiesen [340;445;519;538], die sich jedoch hauptsächlich auf Neovaskularisierungsprozesse unter pathologischen Bedingungen, wie Ischämie, Inflammation und Karzinogenese, beschränkt [36;67;162;178;279;324;325]. Dieser Prozess scheint dabei abhängig von einer starken Expression des Liganden und einer Hochregulierung von VEGFR-1 [324;325]. VEGF-B hemmt über NRP-1 und VEGFR-1 bereits in nicht-angiogener Dosis die Apoptose [280;567]. Allerdings wirkt es wohl nur eingeschränkt mitogen [340;366;445]. Der Wachstumsfaktor induziert jedoch Migration z.B. von Endothelzellen, Monozyten und myeloiden Progenitorzellen [3;31;81;366;419;541]. Dennoch scheint die VEGF-B-vermittelte Angiogenese primär auf Gefäßaussprossung und nicht auf der Rekrutierung von Endothelzellvorläufern zu basieren [324]. Der Ligand besitzt neuroprotektive Funktion und ist in die Neurogenese involviert [44;471;472]. Zudem lässt seine starke Expression in Gewebe mit hohem metabolischen Umsatz auf eine mögliche Verbindung mit dem zellulären Energiemetabolismus schließen [1;366]. VEGF-B ist nicht an der Lymphangiogenese beteiligt [413] und induziert im Gegensatz zu PlGF über VEGFR-1 keine gesteigerte Gefäßpermeabilität [324].

VEGF-B wird in diversen Karzinomen exprimiert, z.B. im Thymom [425], Pankreas- [530], Kolorektal- [234], Schilddrüsen, [484] und Mammakarzinom [9]. Allerdings ist

seine funktionale Rolle in der Karzinogenese nicht ganz klar [58]. Der Ligand induziert Tumorangiogenese [178]. Eine entsprechende Verknüpfung mit der Tumorvaskularisierung besteht z.B. im HCC [226], jedoch nicht im Kolorektalkarzinom [234]. Allerdings wird sein Rezeptor VEGFR-1, außer auf Blutgefäßendothelzellen und Monozyten [64;81], auch auf einer Vielzahl von Tumorzellen exprimiert [468] und ermöglicht somit deren autokrine Beeinflussung. Dabei induziert VEGF-B vor allem die Migration und Invasivität maligner Zellen, jedoch kaum ihre Proliferation [116;530]. Zusätzlich wirkt der Ligand anti-apoptotisch [567] und vermittelt die EMT [546]. Letzteres könnte auch den Einfluss des Wachstumsfaktors auf die frühe Tumorentstehung erklären [163].

VEGF-B wird z.B. im Kolorektal- [163] und Mammakarzinom [154] von den Tumorzellen selbst exprimiert. Eine Überexpression des Karzinoms im Vergleich zum Normalgewebe wird beispielsweise im Phäochromozytom [278], jedoch nicht im Kolonrektal- [17;163] oder Mammakarzinom [154] beobachtet. Eine Assoziation der VEGF-B-Expression mit der Malignität findet sich z.B. direkt im Prostatakarzinom [457], dagegen invers im Kolorektalkarzinom [163] und nicht im papillären Schilddrüsenkarzinom [484]. Die wenigen existierenden Studien schließen fast vollständig eine Assoziation des Liganden mit dem T-Stadium, z.B. im Mammakarzinom [333], dem Tumorgrad und Tumorgröße, z.B. im Kolorektalkarzinom [163], aus. Eine Verknüpfung der VEGF-B-Expression mit dem Lymphknotenstatus zeigt sich partiell im Kolorektalkarzinom [163;234]; allerdings lässt sich in dieser Tumorentität kein Zusammenhang mit der Fernmetastasierung [234] oder dem Tumorstadium [17;163] feststellen. Dagegen korreliert der Ligand mit dem Stadium zumindest im HCC [226]. In lokal metastasierten Mammakarzinomen wirkt sich eine VEGF-B-Expression negativ auf das Überleben aus [333]. In NSCLCs mit Stadium I und II ist VEGF-B ebenfalls mit einer Verkürzung der Überlebenszeit assoziiert, im Stadium III und IV dagegen mit einem längeren Überleben [68].

In den Ileumkarzinoiden fand sich eine starke VEGF-B-Expression, die im Primar und den Lymphknotenmetastasen signifikant höher war als in normaler Ileummukosa. Mit Bezug auf die fehlende Expression in naiven EC-Zellen, die von Modlin et al. publiziert wurde [315], kann somit von einer Hochregulierung des Liganden im Rahmen der Karzinogenese der Ileumkarzinoide ausgegangen werden. Allerdings fielen die Werte mit zunehmendem T-Stadium teilweise signifikant ab. Auch die Expressionssenkungen in Karzinoiden mit Fernmetastasen im Vergleich zu Tumoren mit lokal begrenzter

Filialisierung, sowie in großen Primaren im Vergleich zu mittelgroßen und kleinen EC-Zell-Malignomen erreichten Signifikanz. Dagegen ergab sich keine Assoziation mit dem KI-67-Index oder dem Tumorgrad. Entsprechend der angiogenen Wirkung von VEGF-B korrelierte die Expression des Liganden positiv mit der MVD. Überraschend war hingegen die inverse Verknüpfung des Wachstumsfaktors mit der ITL, die mit dem aktuellen Wissensstand über die VEGF-B-Wirkung kaum erklärt werden kann. Patienten mit einer hohen VEGF-B-Expression überlebten signifikant länger.

Zusammengefasst könnte VEGF-B in Ileumkarzinoiden überexprimiert und mit der Angiogenese assoziiert sein. Allerdings fiel seine Expression signifikant mit zunehmendem Progress der Karzinoide ab und war mit einer längeren Überlebenszeit assoziiert, was den hauptsächlich malignitätsfördernden Eigenschaften des Liganden entgegenstand [116;178;530;546;567]. Möglicherweise hat dieser Wachstumsfaktor, wie in anderen Tumorentitäten [163;546], primär eine Rolle in der Frühphase der Karzinoidentstehung. Eine anti-kanzerogene Wirkung wird dagegen in keiner Publikation diskutiert. Der Expressionsverlust könnte somit im Zusammenhang mit Entdifferenzierungsprozessen und folglich zunehmender Aggressivität der Tumoren stehen und VEGF-B als positiv prognostischer Marker für das EC-Zellkarzinoid des Ileums dienen.

VEGF-C wird während der Embryogenese vor allem in Bereichen der Lymphgefäßentwicklung, aber auch im zentralen Nervensystem und Herz exprimiert [264;366]. Postnatal sinkt die Expression in den meisten Geweben, bleibt aber beispielsweise in Lymphknoten, Endothelzellen und in neuroendokrinen Zellen der Hypophyse, des Pankreas, Nebennierenmarks und Gastrointestinaltrakts nachweisbar [366;378;552]. Der Wachstumsfaktor kann als Ligand an Nrp-1 und -2 [11;232;418], VEGFR-3 und in prozessierter Form auch an VEGFR-2 binden [1;215;216]. Dabei ist die Affinität des prozessierten VEGF-C gegenüber VEGFR-2 dreifach schwächer als gegenüber VEGFR-3 [358] und zehnfach niedriger als die Affinität von VEGF-A an VEGFR-2 [439]. Zudem ist die Rezeptor-vermittelte Wirkung abhängig vom jeweiligen Liganden, so zeigen sich Unterschiede zu VEGF-A [61;222] und sogar zu VEGF-D, trotz des übereinstimmenden Rezeptorprofils [251]. VEGFR-2 wird primär auf proliferierendem Blutgefäßendothel [2;58;366], allerdings auch auf LECs exprimiert

[186;500]. Dagegen findet sich VEGFR-3 hauptsächlich auf Lymphgefäßendothel [8;205], jedoch ebenfalls auf Endothelzellen pathologischer Neovaskularisierung [377]. Zusätzlich werden beide Rezeptoren auf nicht-endothelialen Zellen nachgewiesen [1;58;88;439]. Entsprechend des Wirkungsprofils von KDR und Flt-4 induziert VEGF-C vor allem Lymphangiogenese, aber auch Angiogenese [11;61;232;358;413;468;481;505]. In der Embryogenese ist der Ligand entscheidend an der Entstehung des Lymphgefäßsystems beteiligt, dagegen ist die kardiovaskuläre Entwicklung von einem Knock-out nicht betroffen [160;286]. Der Wachstumsfaktor induziert die Migration und Proliferation [61;215;297] und hemmt die Apoptose [366;383] von Zellen. Zudem stimuliert er über VEGFR-2 die Tubulusformation von Endothelzellen [250] und Gefäßpermeabilität [216;222]. Makrophagen werden von ihm chemotaktisch angelockt. Allerdings kann VEGF-C auf sie pro-apoptotisch wirken und scheint sowohl über diesen Mechanismus, als auch über die Regulation der Lymphgefäßfunktion und der Leukozytenmigration die Immunantwort zu beeinflussen [366]. Möglicherweise hat der Ligand auch eine parakrine Rolle bei der Peptidfreisetzung aus den Sekretgranula bestimmter neuroendokriner Zellen [378].

VEGF-C kann in diversen Karzinomen in den Tumorzellen selbst nachgewiesen werden, z.B. im Magen- [14;364;553] und Kolorektalkarzinom [144;163;319] und es besteht häufig eine Überexpression gegenüber dem jeweiligen Normalgewebe, z.B. im Schilddrüsen- [56], Magen- [14;553], und meist im Kolorektalkarzinom [17;144;163;187]. VEGFR-2 und VEGFR-3 werden sowohl auf Blut- und Lymphgefäßen von Tumoren [205;366;377;500], als auch auf Karzinomzellen selbst, z.B. im Magen- [77;491], Pankreasadeno- [514;517], Kolorektal- [376], sowie endokrinen Pankreaskarzinom [164] und VEGFR-2 zusätzlich in diversen gastrointestinalen NET insbesondere in EC-Zelltumoren [262], exprimiert. Dementsprechend induziert VEGF-C in Karzinomen zum einen Tumorangiogenese [222;263], sowie intratumorale und peritumoralen Lymphangiogenese [205;383;500]. Der Wachstumsfaktor korreliert beispielsweise im Ösophagus- [194], Kolorektal- [101] und Pankreasadenokarzinom [566], sowie teilweise im Magen- [220;521] und endokrinen Pankreaskarzinom [420;447] positiv mit der LVD. Eine Assoziation zur MVD besteht z.B. im Ösophagus- [194] und Kolorektalkarzinom [187], jedoch nicht im endokrinen Pankreaskarzinom [164]. Studien zum Magenkarzinom sind in diesem Punkt hingegen widersprüchlich [14;22;191;364].

Zum anderen wirkt der Ligand autokrin stimulierend auf die Migration und teilweise auf die Proliferation [122;469] und hemmend auf die Apoptose von Karzinomzellen [123;430]. Dadurch steigert der Ligand die Invasivität, das Wachstum, und vor allem das metastatische Potential der Tumoren [222;366;468;469]. Dabei ist VEGF-C vor allem mit der Lymphknotenmetastasierung assoziiert [439;473] und soll entsprechend des Großteils der Publikationen generell auch mit der Entstehung von Fernmetastasen verknüpft sein [11;251;449;468;473;554]. Jedoch korreliert die VEGF-C-Expression z.B. im Magen- [441;553], Schilddrüsen- [56], sowie endokrinen Pankreaskarzinom [164;420] nicht und im Kolorektalkarzinom nur partiell [234;365] mit dem Fernmetastasierungsstatus. Dagegen ist der Wachstumsfaktor beispielsweise im Ösophagusadeno- [518], Schilddrüsen- [56;484] und Magenkarzinom [220;441;553] mit der Lymphknotenmetastasierung assoziiert, aber nicht im endokrinen Pankreaskarzinom [420] und nur teilweise im Kolorektal- [144;163;187;234;365] und Pankreasadenokarzinom [448;566]. Ein Zusammenhang der Expression von VEGF-C mit dem T-Stadium existiert z.B. im Ösophagusadenokarzinom [518], allerdings im Kolorektal- [163;187;319;365] und Magenkarzinom [14;22;191;441;553] nur partiell. Eine Assoziation des Liganden mit der Tumorgröße besteht selten, z.B. im Kolorektalkarzinom [163], und wird meist ausgeschlossen, z.B. im Magen- [364] und endokrinen Pankreaskarzinom [420]. Ebenso scheint der Tumorgrad selten mit der Expression von VEGF-C verknüpft zu sein, wie z.B. im Kolorektalkarzinom [163;319], meist jedoch nicht, z.B. im Magen- [14;441] und Ösophagusadenokarzinom [518]. Der Wachstumsfaktor wird im Kolorektal- [144;163] und endokrinen Pankreaskarzinom [420] mit zunehmender Malignität der Tumoren stärker exprimiert. VEGF-C gilt in vielen Tumorentitäten als prognostisch nachteilig, mit einer negativen Wirkung auf die Überlebenszeit [11;103]. So korreliert der Ligand auch im Magen- [220] und Kolorektalkarzinom [187] mit einer Verkürzung des rezidivfreien Überlebens. Dagegen wird die Korrelation mit einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit, die beispielsweise im Kolorektalkarzinom [187;365] besteht, beim Magenkarzinom nur selten [191;220;441;521] und beim Ösophagusadenokarzinom [518] nicht nachgewiesen.

VEGF-C wurde entsprechend Ergebnissen in anderen Studien stark in endothelialen HUVECs [220], in PC-3-Zellen [215] und pankreatischen MIA PaCa-2-Zellen exprimiert. Dagegen fehlte eine Expression in den Magenkarzinomzelllinien AGS und KATOIII [220]

und auch in der neuroendokrinen BON-6-Zelllinie, was Forschungsergebnissen zum endokrinen Pankreaskarzinom widersprach [164;420].

In den Ileumkarzinoiden zeigte sich eine deutliche, wenn auch im Vergleich zu den anderen VEGF-Liganden offensichtlich geringere Expression von VEGF-C. Dabei gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der normalen Mukosa und dem malignen Gewebe. Zudem lassen Ergebnisse von Partanen et al. auf eine basale VEGF-C-Expression in EC-Zellen schließen [378]. Eine Überexpression des Liganden in den Ileumkarzinoiden erscheint deswegen unwahrscheinlich. Die Expressionswerte für VEGF-C verhielten sich direkt proportional zu denjenigen der VEGFRs und anderen VEGFs, jedoch nicht zur VEGF-D-Expression. VEGF-C korrelierte in den EC-Zellkarzinoiden positiv mit der MVD, nicht mit der PTL, jedoch überraschender Weise invers mit der ITL. Damit standen die Ergebnisse im Kontrast zu anderen Studien mit endokrinen Pankreaskarzinomen, in denen der Ligand nicht mit der MVD [164], aber positiv mit der ITL und PTL assoziiert ist [447]. Ebenso kontrovers zu diesen Publikationen [164;420] und der allgemeinen Theorie [469] war VEGF-C in den Ileumkarzinoiden invers mit der Fernmetastasierung, der Tumorgröße und teilweise auch dem T-Stadium assoziiert. Keinen Zusammenhang zeigte der Faktor mit dem Tumorgrad und dem Proliferationsindex KI-67. Zusätzlich war VEGF-C auch nicht mit der Überlebenszeit der Patienten verknüpft.

Zusammenfassend könnte VEGF-C in den Ileumkarzinoiden dieser Studie zwar eine angiogene, jedoch keine lymphangiogene Wirkung gezeigt haben. Aufgrund der inversen Korrelation mit der ITL auf einen anti-lymphangiogenen Effekt des Wachstumsfaktors zu schließen, führt allerdings zu weit. Vermutlich sind in diesem Fall weitere lymphangiogene Faktoren [490] in die Induktion des Lymphgefäßwachstums in ilealen EC-Zellkarzinoiden involviert. Trotz seiner fehlenden Assoziation zum Gesamtüberleben hatte VEGF-C hier eine positive prognostische Aussagekraft bezüglich der Tumoraggressivität. Eine Erklärung für die unerwartete negative Korrelation könnte auch in diesem Punkt die These von Poncet et al. bieten, die eine höhere Differenzierung neuroendokriner Tumore mit einer stärkeren Gefäßdichte assoziiert [392].

VEGF-D bildet aufgrund struktureller und funktioneller Ähnlichkeit zusammen mit VEGF-C eine Subfamilie der vaskulären Wachstumsfaktoren [4]. Dem Homodimer ist, wie VEGF-C, eine Bindung an Nrp-1, Nrp-2 und VEGFR-3, sowie nach proteolytischer Prozessierung an VEGFR-2 möglich [1;4;413;418;419]. Allerdings ist seine Affinität zu VEGFR-2 im Vergleich zu VEGF-A um eine Größenordnung schwächer [439]. Daraus ergibt sich eine langsamere und weniger effektive Aktivierung des Rezeptors, die zwar die Migration von Endothelzellen, jedoch möglicherweise nicht die Proliferation zulässt [231]. Auch zu VEGF-C zeigen sich trotz des identischen Rezeptorprofils funktionelle Unterschiede [251]. In der Embryogenese ist VEGF-D beispielsweise nicht essentiell zur Entwicklung des Lymphgefäßsystems und kann einen VEGF-C-Knock-out auch nicht ausgleichen [11;160]. VEGF-D wird unter physiologischen Bedingungen in Endothelzellen und diversen Organen, inklusive des Dünndarms, exprimiert [4;8;378] und in vielen Karzinomen hoch reguliert [419]. Seine Rezeptoren werden auf Endothelzellen exprimiert, VEGFR-2 hauptsächlich in Blutgefäßen, VEGFR-3 dagegen vor allem auf Lymphgefäßen [58]. Allerdings sind beide jeweils auch auf der anderen Endothelzellart [186;377], sowie auf nicht-endothelialen Zellen zu finden [1;58;88;439]. Dementsprechend wirkt VEGF-D durch Induktion der Migration und Proliferation und Hemmung der Apoptose von LECs lymphangiogen [11;505]. Die VEGF-D-induzierte Angiogenese ist dagegen diffus und nicht so stark wie bei VEGF-A [413]. Der Wachstumsfaktor stimuliert die Rekrutierung von Perizyten und die Migration von Endothelzellen [231;413]. Seine mitogene Wirkung auf Letztere ist jedoch umstritten [8;231]. Zusätzlich steigert VEGF-D die Gefäßpermeabilität [413] und vermittelt die Apoptose von Makrophagen [430].

In malignen Prozessen soll der Ligand sowohl die intratumorale als auch die peritumorale Lymphangiogenese [251;454;500], sowie die Tumorangiogenese induzieren [366]. VEGF-D korreliert dementsprechend positiv mit der ITL und PTL des Insulinoms [251] und duktalen Pankreaskarzinoms [517;566], allerdings nur partiell mit der Lymphgefäßdichte des Magenkarzinoms [220;440;521] und sogar invers mit der PTL des Kolorektalkarzinoms [101]. Ähnlich unbeständig ist der angiogene Einfluss des Liganden auf verschiedene Karzinome. So ist der Ligand mit der MVD im duktalen Pankreas- [517], sowie teilweise im Kolorektalkarzinom [187;531] positiv, dagegen im Insulinom negativ [251] und im Magenkarzinom [220;364] nicht assoziiert.

Da die VEGF-D-Rezeptoren allerdings auch in diversen Tumorzellen nachgewiesen werden [341;468], liegt zusätzlich eine autokrine Wirkungsweise des Wachstumsfaktors nahe. VEGF-D wird in vielen Tumorentitäten mit der Entwicklung von Lymphknoten- und Fernmetastasen [11;366], dem Tumorwachstum [454] und einem negativen Einfluss auf das Überleben [11] in Verbindung gebracht. Der Ligand wird z.B. im Insulinom [251], Magen- [440;521], Kolorektal- [136] und Pankreasadenokarzinom [448;517] deutlich exprimiert, jedoch kaum im endokrinen Pankreaskarzinom [447]. Im Zytoplasma der Tumorzellen selbst lässt sich der Ligand beispielsweise im Kolorektal- [144;163;319] und Magenkarzinom [364] finden. Eine klare Überexpression im Malignom gegenüber dem Normalgewebe zeigt sich z.B. im Magenkarzinom [77;220;440] und teilweise auch im Pankreasadeno- [448;517] und Kolorektalkarzinom [187;376;531]. Wobei allerdings für Letzteres ebenso ein deutlicher Expressionsabfall gegenüber der normalen Kolonmukosa beschrieben wird [144;163]. Dagegen ist bei Kolorektalkarzinomen partiell auch eine Expressionszunahme mit steigender Malignität nachweisbar [144;163;531]. Eine Korrelation VEGF-D-Expression mit dem T-Stadium findet sich mitunter, jedoch selten im Magen- [77;220;440;441] und Kolorektalkarzinom [136;163;187;319;365]. Ebenso heterogen sind auch die Ergebnisse zur positiven Assoziation des Wachstumsfaktors mit der Tumorgröße im Magenkarzinom [364;440]. Indessen scheint die Größe im Kolorektalkarzinom [163] nicht und im Insulinom [251] sogar invers mit dem Faktor verknüpft zu sein. VEGF-D korreliert weder mit der Differenzierung, noch mit dem Tumorgrad des Magen- [77;220;440;441] oder Kolorektalkarzinoms [136;163;319;531]. Die Lymphknotenmetastasierung ist dagegen mit Expression des Liganden im Insulinom [251] und in einem Großteil der Studien zum Magen- [77;220;364;440;441], Kolorektal- [136;144;163;187;319;365;531] und Pankreasadenokarzinom [261;448;517;566] verknüpft. Im Kontrast dazu ist die Entwicklung von Fernmetastasen zwar im Insulinom [251], jedoch nicht im Pankreaskarzinom [261] und meist nicht im Magen- [77;440;441] und Kolorektalkarzinom [136;234;365] mit VEGF-D assoziiert. Eine erhöhte VEGF-D-Expression korreliert allerdings sowohl im Magen- [77;220;440], als auch im Kolorektalkarzinom [187;531] mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben. Ein Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben fehlt im duktalen Pankreaskarzinom [448]; dagegen zeigt sich in der überwiegenden Mehrheit der Publikationen zum Magen- [77;220;440;441;521] und Kolorektalkarzinom [136;187;365;531] ein signifikant negativer Einfluss der VEGF-D-Expression auf die Überlebenszeit.

VEGF-D wurde in allen Zelllinien auf niedrigem Niveau exprimiert. In PC-3-Zellen überstieg die Expression die Werte der anderen Zellarten um eine Größenordnung, in den gastrischen AGS-Zellen um das Hundertfache. Letzteres entsprach Ergebnissen in einer anderen Studie [220].

In den Ileumkarzinoiden zeigte sich eine starke VEGF-D-Expression mit signifikant niedrigeren Werten in der normalen Dünndarmmukosa als in den Primaren und Lymphknotenmetastasen. Unter Einbezug der mangelnden Expression des Liganden in gastrointestinalen neuroendokrinen Zellen [378] ist eine Überexpression von VEGF-D in Ileumkarzinoiden somit wahrscheinlich. Im Kontrast zu den anderen vaskulären Wachstumsfaktoren korrelierte VEGF-D jedoch mit keinem anderen Liganden oder Rezeptor der VEGF-Familie. Zudem war der Ligand hier weder mit der MVD, noch mit der PTL bzw. ITL assoziiert. Da jedoch seine Rezeptoren VEGFR-2 und -3 deutlich nachgewiesen werden konnten und für VEGFR-2 bereits ein immunhistochemischer Nachweis in malignen Zellen gastrointestinaler EC-Zelltumore besteht [262], ist auch in den Karzinoiden des terminalen Ileums eine autokrine Induktionsschleife möglich. Es zeigte sich allerdings keine signifikante Verknüpfung mit der hepatischen Metastasierung, dem KI-67-Index, dem Tumorgrad oder dem maximalen Durchmesser des Primars. Im Kontrast zu den meisten anderen Faktoren, stieg die VEGF-D-Expression jedoch tendenziell in größeren Karzinoiden und mit zunehmendem T-Stadium teilweise sogar signifikant an. Ein Zusammenhang mir der Überlebenszeit der Patienten erwies sich aber nicht.

VEGF-D ließ sich somit weder mit der Lymphangiogenese noch mit der Angiogenese ilealer EC-Zellkarzinoide assoziieren. Der Ligand zeigte jedoch außergewöhnlicher Weise eine, wenn auch dezente, negative prognostische Tendenz, die in dieser Arbeit nur noch für MMP-13 zu beobachten war und den Ergebnissen zu den anderen VEGFs zuwiderlief. Eine solche Differenz z.B. für VEGF-C wird auch in anderen Tumorentitäten beschrieben [251] und könnte auf funktionale Gegensätze der VEGF-Liganden in der Karzinogenese hinweisen. Zudem könnte die mangelnde Korrelation der Expressionsdaten auf einer unterschiedlichen Regulation der Liganden in den Ileumkarzinoiden basieren.

4.4. Angiogenese

Zellen benötigen zum Überleben Nährstoffe und Sauerstoff, dessen maximale Diffusionsweite nur 100-200 µm beträgt [67]. Dementsprechend ist auch in der Karzinogenese nach Erreichen eines Durchmessers von 0,2 bis 2 mm (circa 10^5-10^6 Zellen) die Gefäßentwicklung für ein weiteres Wachstum unbedingt erforderlich [58;419]. Es werden zwei Formen des Gefäßwachstums unterschieden: die Vaskulogenese und die Angiogenese [419]. Bei der Vaskulogenese entstehen Gefäße de novo aus endothelialen Vorläuferzellen [65]. Die Angiogenese bildet neue Blutgefäße durch Aussprossung aus einem vorbestehenden Gefäßnetzwerk, dabei teilen sich reife Endothelzellen [419;421]. Die Gefäßentwicklung ist ein komplexer Prozess, der eine fein abgestimmte Balance zwischen einer Vielzahl stimulatorischer und inhibitorischer Signale erfordert [66]. Pro-angiogene Zytokine und Wachstumsfaktoren sind unter anderen VEGFs, FGFs, Angiogenin, PDGFs, IL-8, die von diversen Zelltypen sezerniert werden können und entweder direkt chemotaktisch bzw. mitogen auf Endothelzellen wirken oder indirekt [421]. Für das Gefäßwachstum ist auch der Abbau der ECM durch Proteasen, wie MMPs, erforderlich [65]. Bestandteile der ECM und der Basalmembran vermitteln selbst sowohl pro- als auch anti-angiogene Signale an Endothelzellen [421]. Zudem wirkt die ECM als ein Speicher für latente angiogene Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF [421]. Auch endogene Inhibitoren der Angiogenese sind zahlreich [66]. Angiostatin oder bioaktive Kollagenspaltprodukte wirken direkt hemmend auf Endothelzellen, andere Substanzen indirekt durch Inhibition von Wachstumsfaktoren, z.B. Angiopoitien-2 und lösliche VEGF-Rezeptoren, wie sVEGFR-1 [421;506]. In der Embryogenese dienen Gefäße nicht nur Ernährungszwecken sondern auch als Richtstruktur für die Organentwicklung [66]. Im ausgewachsenen Organismus bleibt die endotheliale Zellteilungsfähigkeit grundsätzlich bestehen und kann z.B. bei der Wundheilung durch Hypoxie oder Entzündungsprozesse induziert werden [66]. Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Stimulation und Inhibition und die konsekutive irreguläre Angiogenese sind mit einer Vielzahl von Erkrankungen verbunden, wie z.B. neurodegenerativen Erkrankungen, ischämischen oder entzündlichen Prozessen [65;66;421].

Bei der Initiierung der Tumorangiogenese wird von einem „angiogenen Switch“ gesprochen, der die Balance zu einem Überschuss pro-angiogener Signale verschiebt und häufig bereits in einem frühen, prämalignen Stadium auftritt [67;162]. Signale, die diese Veränderung in Tumoren triggern, sind Entzündungsreaktionen innerhalb des Tumors, metabolischer Stress, wie Hypoxie und Azidose, und genetische Mutationen, die Onkogene aktivieren oder Tumorsuppressorgene ausschalten [67;421]. Es kommt dadurch zu einer exzessiven Sekretion von VEGF-A, sowie weiteren angiogenen Faktoren durch Tumor-, Stroma- und Endothelzellen [58;162;496]. Dies führt zu Endothelzellproliferation und Rekrutierung von zirkulierenden myeloiden VEGFR-2-exprimierenden endothelialen und VEGFR-1-exprimierenden hämatopoetischen Progenitorzellen [421]. Abgesehen von der klassischen Angiogenese werden in Tumoren auch alternative Formen der Gefäßentstehung beschrieben [419]. Vaskulogenes Mimikry, Kooperation, Mosaikgefäße und das „intussusceptive“ Gefäßwachstum ermöglichen die Entstehung gefäßähnlicher Strukturen, die unter Einbeziehung von Stroma, Tumorzellen und der ECM teilweise oder ganz auf Endothelzellen verzichtet [419]. Dementsprechend ist die Tumorvaskularisierung, im Gegensatz zu der homogenen, streng hierarchisch organisierten physiologischen Gefäßstruktur, wirr geschraubt, mit dilatierten, asymmetrischen und durchlässigen Gefäßen [67;419;421]. Dadurch ist der Blutfluss in Tumoren chaotisch, was zu einer aggressiveren Tumorzellpopulation mit höherer metastatischer Potenz, Chemoresistenz und einer schlechteren Prognose führt, und Metastasierung erleichtert [58;182]. Die somit paradoxe therapeutische Wirkung anti-angiogener Substanzen erklärt sich allerdings durch die Normalisierung des Gefäßsystems mit konsekutiver gesteigerter Chemosensibilität von Tumorzellen und erschwerter Metastasierung, sowie der Inhibition autokriner pro-kanzerogener Effekte der vaskulären Wachstumsfaktoren [58].

Zur Quantifizierung der Angiogenese dient die mikrovaskuläre Dichte, MVD [526]. In der vorliegenden Arbeit wurde sie zunächst genutzt, um ein immunhistochemisches Korrelat zu den Expressionsdaten der vaskulären Wachstumsfaktoren zu erhalten. Eine erhöhte Expression des Hauptangiogenesefaktors VEGF-A, der vor allem über VEGFR-2 die Proliferation von Endothelzellen induziert, aber auch an VEGFR-1 binden kann, ist in Tumoren allgemein mit einer verstärkten Vaskularisierung assoziiert [1;58;125]. Dies kann in diversen Tumorentitäten nachgewiesen werden, wie z.B. im Magen- [213;523], Ösophagus- [233], Kolorektalkarzinom [165;559] und teilweise im

Pankreasadenokarzinom [282;343]. Dagegen fehlt eine Korrelation zwischen MVD und VEGF-A bisher in den meisten Studien zum NET des Pankreas [300;476], Schilddrüsenkarzinom [93] und zu EC-Karzinoiden des Darms [262]. Allerdings beweisen Zhang et al. in einer Karzinoidgruppe gemischten Ursprungs eine positive Assoziation zwischen VEGF-A-Expression und MVD [570]. Trotz des mittlerweile nachgewiesenen Einflusses von VEGF-B auf die pathologische Angiogenese über VEGFR-1 [44;292;445], gibt es kaum Publikationen über Korrelation mit der MVD. VEGF-C, das über VEGFR-3 und in prozessierter Form über VEGFR-2 Lymphangiogenese und Angiogenese induzieren kann [58;366], ist z.B. im Ösophaguskarzinom [285] und teilweise im Magenkarzinom [22;521] mit der MVD verknüpft. VEGF-D zeigt mit dem gleichen Rezeptor- und Funktionsspektrum [58;366] z.B. im Ösophagus- [285] und Magenkarzinom [521] eine Assoziation, jedoch nicht im Kolorektalkarzinom [531]. VEGFR-1, der mit seinen Liganden VEGF-A, VEGF-B und PlGF hauptsächlich mit der pathologischen Angiogenese assoziiert wird [65;439], korreliert z.B. im Magenkarzinom mit der MVD [523], jedoch nicht im Ösophaguskarzinom [233]. VEGFR-2, Rezeptor für die prozessierte Form von VEGF-C und VEGF-D [439] und primärer Mediator der VEGF-A-Signalgebung [58], wird überraschend selten mit der Gefäßdichte verknüpft, z.B. im Kolorektalkarzinom [165] allerdings nicht im Ösophaguskarzinom [233]. VEGFR-3, der VEGF-C und VEGF-D binden kann und eigentlich in die Lymphangiogenese involviert ist, jedoch auch auf proliferativem Blutgefäßendothel exprimiert wird [1;58;377;413], korreliert z.B. im Kolorektalkarzinom positiv mit der MVD [531].

In den Ileumkarzinoiden korrelierten der Großteil der vaskulären Wachstumsfaktoren und alle Rezeptoren erwartungsgemäß mit der Gefäßdichte. VEGF-D war als einziger Ligand nicht mit der MVD der Karzinoide assoziiert. Die positive Verknüpfung der VEGF-A-Expression entsprach den Ergebnissen von Zhang et al. in einer Karzinoidgruppe gemischten Ursprungs [570]. Dagegen kann diese Korrelation in Studien zum NET des Pankreas [300;476] und zu EC-Karzinoiden des Darms [262] nicht nachvollzogen werden. Ebenso zeigen VEGFR-1 und VEGFR-2 bei La Rosa et al. in EC-Zelltumoren des Darms keinen Zusammenhang mit der MVD [262]. Dennoch konnte immerhin in der vorliegenden Arbeit für Karzinoide des terminalen Ileums eine direkte Assoziation zwischen der Expression der vaskulären Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren und der Angiogenese nachgewiesen werden. Das abweichende Ergebnis für VEGF-D entsprach dabei dessen durchgängig zu den übrigen Liganden konträren Verhalten.

Die Angiogenese erfordert die Invasion von Endothelzellen in das benachbarte Gewebe, dabei sind Proteasen, wie die MMPs, von entscheidender Bedeutung [421;461]. Dementsprechend wichtig sind die Matrixmetalloproteinasen, vor allem MMP-2 und MMP-9, auch beim "angiogenen Switch" in der Tumorentstehung [206;237;421]. Die pro-angiogene Wirkung der MMPs umfasst jedoch nicht nur die Bahnung eines Weges für die Einwanderung von Endothelzellen, sondern erweist sich als sehr komplex [105;237;456;461]. Matrixmetalloproteinasen vermitteln Migration, Invasion und Proliferation der Endothelzellen, haben Anteil an der Röhrenformation und erhöhen die Bioverfügbarkeit angiogener Faktoren, z.B. durch Abspaltung des hemmenden CTGF von VEGF-A [105;421;511]. Zusätzlich haben MMPs aber auch anti-angiogene Effekte beispielsweise durch Freisetzung von endogenen Angiogeneseinhibitoren [105;237;426;509;511]. Die TIMPs sind entsprechend ihrer Wirkung auf die MMPs primär anti-angiogen wirksam [206;353;421]. Zusätzlich inhibieren TIMP-2 und TIMP-3, das in hoher Konzentration VEGFR-2 direkt blockiert [397], auch MMP-unabhängig das Gefäßwachstum [15;26;206;353;399;421;462;463]. Allerdings besitzen TIMPs auch pro-angiogene Aspekte. Durch Inhibition der MMP-Aktivität hemmen sie konsekutiv deren Produktion von Angiogeneseinhibitoren. Darüber hinaus stimuliert TIMP-1 die Expression von VEGF-A [206;557].

Dennoch konnte die Expression der MMPs und TIMPs im Ileumkarzinoid nicht mit der MVD in Verbindung gebracht werden. Nur das primär anti-angiogene TIMP-3 korrelierte positiv mit der MVD. Diese unerwartete Verknüpfung ist mit den aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen leider nicht zufriedenstellend zu erklären.
In vielen Karzinomen ist eine hohe Gefäßdichte mit einer größeren Malignität und schlechteren Prognose verbunden [563]. Der angiogene „switch“ findet bereits in einem frühen, teilweise noch präkanzerösen Tumorstadium statt [496]. Die Angiogenese ist selbst ist nicht der Auslöser einer malignen Entartung, ermöglicht aber das Wachstum und die Invasivität von Tumoren, durch Bereitstellung von Nährstoffen und Sauerstoff [66;128]. Zusätzlich bietet das neue Gefäßnetz eine Möglichkeit für einen Übergang in den Blutkreislauf und somit zur Ausstreuung von malignen Zellen [58]. Dementsprechend korreliert die MVD bei diversen Tumorentitäten mit einer erhöhten Metastasierung in regionale Lymphknoten, wie z.B. beim Magenkarzinom [290], allerdings nicht im Kolorektalkarzinom [101;559]. Endokrine Pankreaskarzinome zeigen dagegen eine inverse Korrelation der MVD mit der Lymphknoten- und auch Fernmetastasierung [476]. Letztere ist im Allgemeinen eher mit einer erhöhten

Tumorangiogenese assoziiert, z.B. im Magen- [213;290;523], aber nicht im Kolorektalkarzinom [101]. Der wachstumsfördernde Einfluss der Angiogenese spiegelt sich in vielen Karzinomarten durch die positive Korrelation der MVD mit der Tumorgröße wieder, z.B. im Kolorektalkarzinom [555]. Allerdings verhalten sich pankreatische NET auch in diesem Punkt invers [300] bzw. indifferent [483]. Zudem erhöht die Angiogenese das invasive Potential. Entsprechend weisen diverse Tumore eine direkte Korrelation zwischen dem T-Stadium und der MVD auf, z.B. das Kolorektal- [555;559] und Magenkarzinom [22;213]. Die MVD gilt in Malignomen außerdem als prognostisch [526] und weist häufig einen signifikanten Zusammenhang mit einer verkürzten Überlebenszeit auf, z.B. im Ösophagus- [233], Magen- [290;523], Kolorektal- [97] und Pankreasadenokarzinom [343;483]. Dagegen ist in pankreatischen NET eine erhöhte Gefäßdichte mit einem verlängerten Überleben assoziiert [84;300;476]. Im Gegensatz zu anderen Malignomen, wie z.B. dem Magen- [575] oder Kolorektalkarzinom [531], steigt die MVD in neuroendokrinen Tumoren mit EC-Zellursprung bzw. aus dem Pankreas nicht mit der Malignität an, sondern fällt ab [84;262;300;392;476].

In den Ileumkarzinoiden waren kleine Tumore signifikant geringer vaskularisiert als Primare mittlerer Größe. Allerdings schien die proliferative Potenz der Angiogenese mit zunehmendem Wachstum zu schwinden, denn große Karzinoide wiesen, wie teilweise auch pankreatische NET [300;483], eine signifikant geringere Gefäßdichte auf als mittelgroße Tumoren. Unter dem Gesichtspunkt der Assoziation des Zellwachstums mit einer höheren Gefäßdichte und somit besseren Versorgung, wurde auch die mögliche Verknüpfung des Proliferationsindex KI-67 bzw. des Tumorgrades mit der MVD der Ileumkarzinoide untersucht. Es zeigte sich allerdings keinerlei statistischer Zusammenhang. Jedoch korreliert der KI-67-Index in neuroendokrinen Pankreaskarzinomen invers mit der MVD [476]. In den Ileumkarzinoiden stieg die Gefäßdichte zunächst teilweise signifikant mit dem T-Stadium an, im Vergleich zum T3-Stadium fiel die MVD in T4-Karzinoiden jedoch wieder deutlich ab. Diese inverse Assoziation erreicht z.B. in Mausmodellen mit neuroendokrinen Zelllinien Signifikanz [392]. Es zeigte sich zudem eine deutliche Tendenz zu einer niedrigeren Gefäßdichte in hepatisch filialisierten Karzinoiden gegenüber ausschließlich lokal metastasierten Primaren. In endokrinen Pankreastumoren ist diese inverse Verknüpfung ebenso signifikant, wie die Assoziation einer längeren Überlebenszeit mit höherer Gefäßdichte [84;300;476]. In den Ileumkarzinoiden zeigte sich allerdings kein Zusammenhang mit der Überlebenszeit der Patienten.

Endokrine Organe sind stark vaskularisiert, da eine gute Gefäßanbindung für ihre metabolische und endokrine Funktion essentiell ist [488;496]. Auch neuroendokrine gastrointestinale Tumore sind typischer Weise sehr gefäßreich [84;551]. Studien zur Angiogenese in dieser besonderen Karzinomfamilie führen zu unerwarteten Ergebnissen. Die MVD neuroendokriner Pankreaskarzinome ist konträr zu dem allgemeinen Dogma, invers mit der Invasivität, dem Tumorwachstum und der Metastasierung assoziiert und die Prognose verbessert sich mit steigender Gefäßzahl [84;300;476;483]. Nicht nur bei pankreatischen NET, sondern auch bei neuroendokrinen EC-Zelltumoren korreliert zunehmende Malignität mit einer geringeren MVD [262;392]. Poncet et al. vertreten aufgrund dessen die Theorie, dass eine starke Angiogenese eine typische Eigenschaft neuroendokriner Zellen und ein Absinken der MVD im Laufe des Tumorprogresses als Entdifferenzierungszeichen zu werten sei [392]. Unterstützt wird diese These dadurch, dass bei geringerer MVD die Gefäße im endokrinen Pankreaskarzinom einen malignen dysmorphen und proliferativeren Phänotyp besitzen [476]. Das Gefäßsystem in weniger differenzierten NET entspricht ebenso viel eher dem Bild der Tumorangiogenese und ist möglicherweise Ergebnis des sekundär durch Hypoxie oder Akkumulierung genetischer Abnormitäten ausgelösten, angiogenen „Switchs“ [84]. Eine hohe MVD im NET wird von Poncet et al. somit als indirekter Marker für Differenzierung und als prognostisch positiv angesehen [392].

Im Gegensatz dazu konnten Zhang et al. in Karzinoiden unterschiedlichen Ursprungs VEGF-A nicht nur mit der MVD, sondern auch mit einer negativen Prognose korrelieren [570]. Es steht also die Frage im Raum, ob die Differenzierungsthese auch für die hier untersuchten Ileumkarzinoide gilt. Dafür spräche, dass ein Großteil der angiogenen Faktoren inklusive der MVD mit zunehmender Malignität der Karzinoide meist sogar signifikant sinkt und ihre verminderte Expression teilweise prognostisch negativ ist. Widersprüchlich ist dazu allerdings die Erkenntnis, dass normale Serotonin produzierende EC-Zellen wohl kein VEGF-A, VEGFR-1 und VEGFR-2 exprimieren [262]. Es ist also fraglich, ob die Expression angiogener Faktoren in den EC-Zellen der Ileumkarzinoide physiologischer Weise von Anfang an hoch ist und nur im Verlauf der Tumorprogression verloren geht. Es könnten auch initiale Signale zuvor angiogenese-neutrale EC-Zellen im Sinne eines angiogenen „Switches“ zur pro-angiogenen Expression veranlassen. Das nachfolgende Absinken der MVD und Expression könnte sowohl durch einen Differenzierungsverlust, als auch durch Minderung der Induktionssignale verursacht worden sein.

4.5. Lymphangiogenese

Die Hauptaufgabe des Lymphgefäßsystems ist es, durch den Rücktransport der proteinreichen interstitiellen Flüssigkeit und extravasaler Zellen in die Blutzirkulation dem Blutdruck entgegen zu wirken [8;11]. Das Lymphsystem ist zusätzlich in die körpereigene Immunabwehr und Fettabsorption im Darm eingebunden [383]. Lymphkapillare sind im Gegensatz zu Blutgefäßen irregulär geformt, großlumiger, dünnwandig mit einer einlagigen Endothelzellschicht und unvollständigen Basalmembran, ohne Perizyten oder glatte Muskelzellen [11]. Lymphendothelzellen (LEC) sind überlappend angeordnet, können bei einem erhöhten Druck auseinander driften und so durchlässiger werden [383]. Elastische Fasern verankern die Lymphgefäßwände in der ECM und verhindern so ein Kollabieren bei Änderung des interstitiellen Drucks [473;500]. Als Hauptvermittler der Lymphangiogenese gelten VEGF-C und VEGF-D, die über VEGFR-3, der auf LECs exprimiert wird, das Wachstum, die Migration und das Überleben von lymphatischen Endothelzellen induzieren [473]. Allerdings finden sich auf der Oberfläche der LECs auch VEGFR-2 und Nrp2, die ebenfalls Lymphangiogenese initiieren können [11]. VEGF-A kann direkt über VEGFR-2 oder indirekt über Rekrutierung VEGFR-1-positiver Makrophagen Lymphgefäßwachstum anregen [11;186;500]. Die LECs exprimieren zusätzlich die lymphangiogen wirksamen Rezeptoren FGFR, IGFR-1, C-MET, TIE-2, PDGFR-α und PDGFR-β [490]. Somit können zusätzlich FGF-2, IGF-1 und -2, HGF über C-MET, Ang 1 und 2 über TIE-2 und PDGF-AA, -BB und -CC direkt die Lymphangiogenese stimulieren [11;473;490]. Die ECM hat auch auf des Wachstum von Lymphgefäßen einen regulatorischen Einfluss [205]. Lymphendothelzellen exprimieren auf der Zelloberfläche einige spezifische Marker, wie Podoplanin (D2-40), Prox-1 und Desmoplaktin, die zur immunhistochemischen Identifizierung von Lymphgefäßen dienen [8;383;500]. Allerdings wurde hier zur Bestimmung der lymphatischen Gefäßdichte auf LYVE-1 zurückgegriffen, ein integrales Membranprotein, das den Transport von Hyaluron aus der ECM in die Lymphknoten vermittelt, hauptsächlich auf LECs beschränkt ist und auf Endothelzellen von Blutgefäßen nicht nachzuweisen ist [8;383;500].

Lange Zeit wurde die Existenz einer Tumorlymphangiogenese bzw. intratumoraler Lymphgefäße kontrovers diskutiert [473]. Heute hat sich ein Konsens darüber gebildet, dass in der Karzinogenese sowohl präexistente Lymphgefäße einbezogen werden, als auch lymphangiogenes Wachstum induziert wird [205]. Auch der Einfluss tumorassoziierter Lymphgefäße auf die Karzinogenese ist nicht eindeutig. Studien, die sich mit diesem Thema befassen, erbringen selbst in identischen Tumorentitäten widersprüchliche Ergebnisse [473]. Maligne Zellen können in Lymphkapillare durch deren weites Lumen und durchlässige Gefäßwände leichter eindringen als in Blutkapillare und überleben in der langsam fließenden Lymphe besser als im Blut. Somit erscheint eine Etablierung von Tumorzellnestern im Lymphknoten auf diesem Weg logisch [8]. Dennoch kann Lymphangiogenese bzw. eine erhöhte Lymphgefäßdichte (LVD) nicht immer mit dem Auftreten lymphatischer Metastasierung, dagegen teilweise auch mit einer höheren Tumoraggressivität assoziiert werden [205;473]. Lange hielt man die lymphatische Tumorstreuung für einen rein passiven Prozess [205;383]. Indes besitzen die LECs wohl auch eine aktive VEGF-C-vermittelte Funktion bei diesem Vorgang [11]. Zusätzlich sind diese Zellen in der Lage Wachstumsfaktoren und Zytokine zu sezernieren und damit selbst Metastasierung, Tumorwachstum und Invasivität zu induzieren [205;383;500].

Bei Untersuchungen zur Lymphgefäßdichte werden zumeist intratumorale und peritumorale Lymphgefäße unterschieden. Wobei häufig die peritumorale Lymphgefäßdichte (PTL) als wichtiger für eine lymphatische Metastasierung erachtet wird [205], da die wenigen intratumoralen Lymphgefäße meist klein, irregulär und aufgrund des hohen intratumoralen Gewebedrucks und fehlender Ankerfilamente komprimiert und nicht funktional sind [11;58;205;370;473]. Dennoch ist eine intratumorale Gefäßdichte (ITL), ebenso wie die PTL, partiell ein Risikofaktor für Lymphknotenmetastasen und ein kürzeres rezidivfreies Überleben [205]. Im Gegensatz zum erschwerten Flüssigkeitstransport innerhalb eines Tumors erfordert Zellmigration eine Zell-Matrix- bzw. Zell-Zell-Interaktion, die für Tumorzellen und LECs bereits nachgewiesen wurde. Somit bieten intratumorale Lymphgefäße eine naheliegende Möglichkeit zur Auswanderung maligner Zellen aus dem Primärtumor und sind mit Metastasierung verknüpft [205]. Dennoch streuen auch Karzinome, die keine intratumoralen Lymphgefäße aufweisen, wie z.B. die meisten Mammakarzinome [205;473;534].

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine getrennte Untersuchung der peritumoralen und der intratumoralen Lymphgefäßdichten vorgenommen, die sich, wie in den meisten Karzinomen, z.B. im Magenkarzinom [139], signifikant voneinander unterschieden. Dabei fanden sich im Randbereich jedes untersuchten Karzinoids Lymphgefäße, in der Tumormitte jedoch jeweils nur eine sehr geringe Dichte, bzw. in sieben Primaren keinerlei lymphatische Gefäße. Diese Absenz intratumoraler Lymphgefäße in einem hohen Anteil der Tumore wird häufig beobachtet, z.B. im Nierenzellkarzinom [199]. Sowohl die ITL als auch die PTL wurden mit den Expressionsdaten korreliert, um eine mögliche Assoziation der Lymphgefäße mit den vaskulären Wachstumsfaktoren und ihren Rezeptoren, aber auch den Matrixmetalloproteinasen und TIMPs zu untersuchen. Dabei fanden sich unerwartete Ergebnisse. Keiner der VEGF-Liganden und Rezeptoren korrelierte mit der PTL und in Bezug auf die ITL zeigte sich sogar eine inverse Assoziation mit den meisten Faktoren, die für VEGF-C, VEGF-B und VEGFR-2, aber auch für MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2, signifikant war. Als einziger Parameter korrelierte MMP-13 positiv mit der ITL. Diese Ergebnisse sind kaum mit dem aktuellen Kenntnisstand zur Lymphangiogenese überein zu bringen.

VEGF-C, das in Ileumkarzinoiden nicht mit der PTL, jedoch invers mit der ITL korrelierte, gilt als der Hauptfaktor der Lymphangiogenese über VEGFR-3 und kann in Tumoren sowohl peri- als auch intratumorales Lymphgefäßwachstum induzieren [8;11;205]. VEGF-C korreliert z.B. mit der LVD im Kolorektal- [101] und Magenkarzinom [159;521], allerdings nicht im Nebenschilddrüsenkarzinom [142]. Eine positive Assoziation mit der PTL existiert z.B. im endokrinen Pankreaskarzinom [447] und Magenkarzinom [139;560], jedoch nicht im duktalen Mammakarzinom [47]. Die ITL ist mit VEGF-C im endokrinen Pankreaskarzinom teilweise [420;447] und im Magenkarzinom nicht verknüpft [139;560].
Auch VEGF-D, das in EC-Zellkarzinoiden weder mit der ITL noch der PTL assoziiert war, gilt als potenter, allerdings nicht essentieller lymphangiogener Wachstumsfaktor, der intra- und peritumorale Lymphgefäße induzieren kann [8;11;205]. Entsprechend korreliert die VEGF-D-Expression positiv mit der LVD in einigen Tumorentitäten, wie z.B. im Adenokarzinom des Pankreas [566], allerdings invers im Kolorektalkarzinom [101] und positiv mit der PTL, aber nicht mit der ITL im Magenkarzinom [560].

Der Hauptangiogenesefaktor VEGF-A, der in den Karzinoiden keinen Zusammenhang mit der Lymphgefäßdichte hatte, vermittelt seine schwache lymphangiogene Wirkung indirekt über Rekrutierung von VEGFR-1-exprimierenden Makrophagen, sowie direkt über VEGFR-2 [176;205;428;500] und bewirkt eher eine lymphatische Hyperplasie [11;336], wird jedoch in diversen Tumoren mit lymphatischer Metastasierung in Verbindung gebracht [176]. Eine Korrelation der VEGF-A-Expression mit der Lymphgefäßdichte besteht z.B. im Ösophagus- [194] und Magenkarzinom [521], im endokrinen Pankreaskarzinom allerdings nur mit der PTL und nicht mit der ITL [447].

Eine Verbindung von VEGF-B zur Lymphangiogenese wird in der Literatur nicht diskutiert. Es lässt sich zwar über eine mögliche indirekte pro-lymphangiogene Wirkung durch Rekrutierung VEGFR-1-präsentierender Monozyten nach Vorbild von VEGF-A spekulieren [428;500]. Ein unmittelbarer Effekt auf das Lymphgefäßwachstum ist aber aufgrund seines Rezeptorspektrums unwahrscheinlich [567]. Dementsprechend korrelieren ITL und PTL z.B. in Nierenzellkarzinomen nicht mit dem Liganden [199]. Allerdings zeigte sich in Ileumkarzinoiden zwar keine Assoziation mit der PTL, aber eine inverse Verknüpfung mit der ITL.

VEGFR-1 wird nicht auf Lymphendothel, aber auf Makrophagen exprimiert und vermittelt über deren Rekrutierung die indirekte lymphangiogene Wirkung von VEGF-A [428]. Ein Zusammenhang mit der ITL und PTL im ilealen Karzinoid zeigte sich aber nicht. VEGFR-2 kann auf LECs nachgewiesen werden, induziert deren Migration, Proliferation und verhindert ihre Apoptose [11;186;500]. Sein Expressionsniveau korrelierte allerdings nicht mit der PTL und negativ mit der ITL der EC-Zelltumore.

VEGFR-3 wird unter physiologischen Bedingungen im postnatalen Organismus hauptsächlich auf Lymphendothelzellen exprimiert und vermittelt, von VEGF-C oder VEGF-D aktiviert, die Migration, Proliferation und das Überleben von LECs, die embryonale Lymphgefäßentwicklung und Tumorlymphangiogenese [8;11;205;383;453]. Dementsprechend kann der Rezeptor in einigen Tumoren mit der Lymphgefäßdichte assoziiert werden, z.B. im NSCLC [291]. Allerdings wird Flt-4 im Zuge einer Neovaskularisierung in Tumoren und chronisch entzündlichen Wunden auch auf Blutgefäßendothel exprimiert [205;377]. In sofern ist die mangelnde Korrelation der ITL und PTL mit der Expression von VEGFR-3 in den Ileumkarzinoiden dieser Studie, wie auch im duktalen Mammakarzinom [47], durchaus erklärlich. Zumal die Anzahl der Blutgefäße die Zahl der Lymphgefäße, wie auch im Kolorektalkarzinom [101], signifikant um eine Größenordnung überstieg und VEGFR-3 mit der MVD positiv korrelierte.

Den Bausteinen und dem Umbau der ECM wird eine Schlüsselrolle in der Lymphangiogenese zugeschrieben und funktionsbezogene Moleküle, wie Hyaluron, Integrine, IL-7 und MMPs bereiten die wichtigsten Vorbedingungen für Wachstum, Migration, Röhrenformation und Überleben der LECs [204]. Dennoch gibt es kaum Studien, die sich mit der Rolle der MMPs und TIMPs in das Lymphgefäßwachstum befassen. MMP-2 wird mit einer lymphangiogenen Wirkung in Verbindung gebracht [54;338;423], korreliert allerdings im NSCLC nicht mit der LVD [569]. MMP-9 scheint lymphangiogen zu wirken [338], allerdings hat ein Knock-out des entsprechenden Gens, ebenso wie bei MMP-13, keinen Effekt auf die embryonale Lymphgefäßentwicklung [423]. TIMP-1 besitzt wohl keinen Einfluss auf Proliferation, Migration oder Überleben von LECs [434]. Somit ist die inverse Korrelation der ITL mit MMP-2, TIMP-1 und TIMP-2 in den Ileumkarzinoiden mit dem aktuellen Forschungsstand nicht zu erklären. Allerdings entsprach zumindest die positive Assoziation der ITL mit MMP-13 der grundsätzlichen Wirkung der MMPs.

Zusammenfassend kann die fehlende Korrelation peritumoraler und die teilweise negative Korrelation intratumoraler Lymphgefäße mit den VEGF-Rezeptoren in Ileumkarzinoiden vermutlich mit deren Expression auf Blutendothelzellen und Karzinomzellen [205;377], sowie der geringen absoluten Zahl lymphatischer Gefäße in den Primaren im Vergleich zur Anzahl von CD-31-positiven Gefäßen und Tumorzellen erklärt werden. Die fehlende bzw. inverse Assoziation der vaskulären Wachstumsfaktoren mit der ITL und PTL in den neuroendokrinen Tumoren ist vor allem im Fall der Hauptlymphangiogenesefaktoren VEGF-C und VEGF-D verwunderlich, könnte aber auf einen stärkeren Einfluss anderer lymphangiogener Wachstumsfaktoren [490] auf das Lymphgefäßwachstum in Ileumkarzinoiden hinweisen.

Die Forschung kann den Zusammenhang zwischen einer erhöhten Lymphgefäßdichte und einer stärkeren Malignität und Aggressivität von Tumoren nicht eindeutig bestätigen [205]. Diverse Karzinome weisen eine höhere ITL bzw. PTL im Vergleich zum Normalgewebe auf, z.B. das Kolorektal- [138], Ösophagus- [322] und endokrine Pankreaskarzinom [447], in anderen Tumorentitäten sinkt dagegen die Dichte, z.B. im Pankreasadenokarzinom [448]. Zudem zeigen sich in einigen Karzinomen inverse Korrelationen der Malignität mit der ITL, z.B. im Prostatakarzinom [536], und mit der PTL, z.B. im endokrinen Pankreaskarzinom [447]. Dagegen besitzt die LVD im Nebenschilddrüsenkarzinom keine Assoziation mit der Malignität [142]. Metastasierung

ist allerdings ein wichtiger Aspekt der karzinogenen Eigenschaft von Tumorlymphgefäßen, da sie passiv die Ausstreuung maligner Zellen ermöglichen [8]. Naheliegender Weise wird die LVD primär mit der regionalen Lymphknotenmetastasierung verknüpft [383], wobei dieser Zusammenhang bzw. ein Überwiegen des Einflusses einer intratumoralen oder peritumoralen Lage der Gefäße von Studie zu Studie auch in derselben Tumorentität variieren kann [205;500]. Eine Korrelation der Lymphknotenmetastasierung mit der ITL und PTL besteht beispielsweise zum Teil im Ösophagus- [194;322;424] und Magenkarzinom [140;269;560], jedoch nicht im endokrinen Pankreas- [420;447] und Kolorektalkarzinom [101]. Die Entstehung von Fernmetastasen ist z.B. mit der LVD im endokrinen Pankreaskarzinom [420] und mit der PTL (nicht mit der ITL) im Kolorektalkarzinom assoziiert [288]. LECs könnten möglicherweise auch aktiv das Wachstum und die Invasivität von Tumoren beeinflussen [500]. Allerdings korreliert in den meisten Studien die Größe des Primars nicht mit der ITL oder PTL, z.B. im Ösophagus- [322] und papillären Schilddrüsenkarzinom [161], dagegen aber ausnahmsweise mit der LVD in benignen pankreatischen NET [420]. Das T-Stadium zeigt keine Verknüpfung mit der PTL oder ITL im Ösophaguskarzinom [322], korreliert aber mit der PTL, nicht mit der ITL, im Kolorektalkarzinom [288]. Die Überlebenszeit ist weder mit der ITL und PTL im Kolorektal- [138] und Pankreasadenokarzinom [448], noch mit der LVD im Ösophaguskarzinom [424] assoziiert. Allerdings sind Zusammenhänge bezüglich der Prognose einer malignen Erkrankung meist nicht so eindeutig [47;205;501]. Beispielsweise ist eine erhöhte PTL im Magenkarzinom mit einem längerem Überleben verknüpft, die ITL jedoch nicht [140]. Im HNSCC ist dagegen die PTL positiv und die ITL negativ prognostisch für die Überlebenszeit [305].

Im Ileumkarzinoid korrelierte die PTL weder mit einem histopathologischen Parameter, noch mit der Überlebenszeit der Patienten. Im Kontrast dazu war die ITL in kleinen Tumoren signifikant niedriger als in mittelgroßen und großen Karzinoiden, wobei der Wert auch von Tumoren mittlerer Größe zu großen NET deutlich anstieg. Der Proliferationsindex KI-67 und der Tumorgrad konnten allerdings auch hier weder mit der PTL noch mit der ITL in Zusammenhang gebracht werden. Dagegen stieg die ITL in den ilealen NET mit dem T-Stadium, wobei die Unterschiede von T1-Karzinoiden zu den übrigen Stadien Signifikanz erreichten. Zusätzlich war eine erhöhte ITL signifikant mit der Fernmetastasierung und einem kürzeren Gesamtüberleben assoziiert.

Diese Ergebnisse sind mit Beobachtungen im endokrinen Pankreaskarzinom vergleichbar, dessen ITL, im Gegensatz zu der ITL im Adenokarzinom des Pankreas, in Tumoren höher ist als im Normalgewebe und mit einer Fernmetastasierung assoziiert ist [420;447]. Somit könnte die negativ prognostische Aussagekraft der ITL eine Eigenschaft von Tumoren endokrinen Ursprungs sein. Die intratumorale Lymphgefäßdichte war somit der einzige Faktor in dieser Studie, der proportional zur Tumoraggressivität anstieg und in EC-Zellkarzinoiden des Ileums prognostisch negativ war.Da die Tumorlymphangiogenese vermutlich ein frühes Ereignis in der Karzinogenese ist [473], könnten die betreffenden Karzinoide eine frühere Möglichkeit zur Metastasierung haben und ein höheres malignes Potential entwickeln. Ein früher Zeitpunkt der Tumorlymphangiogenese könnte auch die mangelnde Assoziation der ITL und PTL mit der Expression von VEGF-C und VEGF-D in den größtenteils fortgeschrittenen Ileumkarzinoiden dieser Studie erklären. Andererseits könnte die erhöhte intratumorale Lymphgefäßdichte auch eine späte Eigenschaft fortgeschrittener Karzinoide sein, die möglicherweise mit Fibrosierungsprozessen einhergeht.

Ein therapeutischer Nutzen der negativen prognostischen Eigenschaft der ITL ist ungewiss. Denn wenn einige metastatisch kompetente Tumorzellen den Primar verlassen konnten, kann auch eine nachträgliche Unterdrückung der Lymphangiogenese die Lymphknoten- bzw. Fernmetastasierung nicht verhindern [473]. Fraglich ist auch ein direkter Einfluss der Lymphgefäße auf die Aggressivität der Ileumkarzinoide, sowie Symptomatik und das Überleben der Patienten. Zudem konnte die VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3-Achse nicht mit der Lymphgefäßdichte assoziiert werden. Ein therapeutischer Ansatz müsste sich dementsprechend auf die übrigen lymphangiogenen Wachstumsfaktoren und Rezeptoren konzentrieren. Eine anti-lymphangiogene Therapie verspricht also in fortgeschrittenen Ileumkarzinoiden kaum Erfolg, könnte jedoch in einem klinisch unrealistischen frühen Tumorstadium möglicherweise einen positiven Effekt erzielen. Allerdings könnte die ITL als negativer prognostischer Marker in Ileumkarzinoiden fungieren.

4.6. Einflussfaktoren auf die Lebenserwartung

Die 5-Jahres-Überlebensrate (JÜL) von Patienten mit intestinalen Karzinoiden liegt bei 58-68%, die 10-JÜL bei nur 43% [316;346]. Im Vergleich haben jejuno-ileale neuroendokrine Tumore mit einer 5-JÜL von 55-68% und einer medianen Überlebenszeit von 88 Monaten eine schlechtere Prognose als die meisten Karzinoide anderer Lokalisation [57;158;172;316;436;547;578]. Allerdings zeigt eine jüngere Studie von Tomassetti et al. mit Karzinoiden des Ileums eine 5-JÜL von 79% [493], und auch die mediane Überlebenszeit bei einer NET-Erkrankung steigt mit einem späteren Diagnosejahr (1973-1987 95 Monate, 1988-2004 138 Monate) [493;547]. Ob dieser Umstand einer früheren Diagnosestellung aufgrund verbesserter Technik und erhöhter Aufmerksamkeit oder einer therapeutischen, absoluten Verlängerung der Lebenserwartung zu verdanken ist, ist ungewiss. Insgesamt sind jedoch nach 25 Jahren, trotz der Verbesserung der Diagnostik und einigen therapeutischen Innovationen, sowie der langsamen Progression dieser Tumorentität, nur 23% der Patienten mit jejuno-ilealen Karzinoiden gesund [112;551].

In der untersuchten Studiengruppe hatte das Alter bei Erstdiagnose entsprechend der Literatur keinen Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten; ebenso existierte keine Verknüpfung mit dem Geschlecht, das jedoch allgemein kontroverse Daten erbringt [57;158;346;436;493]. Die fehlende Relation einer B-Symptomatik und positiven HIES-Diagnostik mit der Prognose widersprach der allgemeinen Assoziation dieser Faktoren mit einem verkürzten Überleben [417;493]. Wohingegen die mangelnde Korrelation abdominaler Schmerzen und Diarrhöen mit dem generellen Durchschnitt übereinstimmte [493]. Allerdings war eine Flush-Symptomatik in der vorliegenden Arbeit, entsprechend der Literatur, mit einer verkürzten Überlebenszeit der Patienten verknüpft [493].

Unter histopathologischen Gesichtspunkten konnten, entgegen allgemeiner Erkenntnisse, weder ein erhöhtes T-Stadium [57;158;346], noch eine gesteigerte Proliferationsrate im Sinne des KI-67-Indexes bzw. des Tumorgrades mit dem Gesamtüberleben in Zusammenhang gebracht werden [86;346;493]. Auch die in der Literatur prognostisch umstrittenen, histopathologischen Parameter multiple Primärtumore und Tumorgröße hatten keine Assoziation mit der Prognose in dieser Arbeit [57;158;346;493]. Überraschenderweise scheint ein nicht metastasiertes Dünndarmkarzinoid gegenüber einem lokal filialisierten Tumor nur einen geringen Überlebensvorteil zu besitzen. Die mediane Überlebenszeit bei einem jejuno-ilealen

Karzinoid liegt im Falle einer lokal begrenzten Erkrankung (N0M0) bei 115 Monaten (3-/5-/10-JÜL 73%/60-77%/49%), einer lokalen Metastasierung (N1M0) bei 107 Monaten (3-/5-/10-JÜL 83%/73-75%/46%) und einer Fernmetastasierung (N1M1) bei 65 Monaten (3-/5-/10-JÜL 70%/18-54%/15-30%) [158;316;346;547]. In der vorliegenden Studie war die Lebenserwartung von Patienten mit hepatischen Metastasen, entsprechend der allgemeinen Statistik [57;158;346], signifikant verkürzt.

In den letzten 30 Jahren konnte die Prognose von Patienten mit Fernmetastasen allerdings deutlich verbessert werden [547]. Entsprechend lässt sich bei intestinalen Karzinoiden, mit 5-JÜL-Raten von 72% bei Tumoren ohne Fernmetastasierung und von 35-48% mit Fernmetastasen, letztere durch eine aktive interventionelle Behandlung auf über 69% erhöhen [346]. Medikamentöse Therapien konnten jedoch, wie meist auch in der Literatur [493], in der untersuchten Patientengruppe nicht mit einem Überlebensvorteil assoziiert werden. Der Nutzen einer Octreotid-Therapie [578] war hier nicht evaluierbar. Studien zeigen, dass eine chirurgische Therapie sowohl in kurativer, als auch in palliativer Absicht eine signifikante Lebensverlängerung ermöglicht [493], entsprechend waren eine R0-, wie auch eine R1-Resektion mit einem signifikant besseren Überleben als eine R2-Resektion verbunden.

Ein Großteil der untersuchten Expressionsparameter, dies betraf MMP-9, MMP-11, MMP-13, TIMP-1, TIMP-2, VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-1 und VEGFR-3, konnte nicht mit der Prognose der Patienten in Verbindung gebracht werden. Dagegen zeigten die Expressionsniveaus von VMAT-1 und VEGFR-2 eine tendenzielle, sowie von MMP-2, TIMP-3 und VEGF-B eine signifikante Assoziation mit dem Gesamtüberleben. Überraschenderweise war allerdings, entgegen vorheriger Hypothesen, eine hohe Expression prognostisch vorteilhaft.

Die Blutgefäßdichte hatte in der vorliegenden Arbeit, trotz der partiellen inversen Korrelation mit dem Tumorprogress, letztendlich keine Assoziation mit der Lebenserwartung und konnte somit die These von Poncet et al., die eine hohe MVD im gastrointestinalen NET als einen prognostisch positiven Marker definiert, nicht signifikant untermauern [392]. Die Lymphgefäßdichte ist in diversen Tumorentitäten ein sehr inkonsistenter Faktor und scheint in verschiedenen Karzinomtypen unterschiedlich relevant zu sein [473]. Im Gegensatz zur PTL, die keine Assoziation mit dem Überleben zeigte, war jedoch die intratumorale Lymphgefäßdichte für die Ileumkarzinoide dieser Studie der einzige Parameter, dessen Steigerung einen signifikant negativen prognostischen Wert besaß.

4.7. Therapeutische Optionen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, potenzielle Therapieansätze für Patienten mit Ileumkarzinoiden zu erforschen. Denn der Heilungserfolg bei dieser Tumorentität ist noch immer gering und die Möglichkeiten zur gezielten Behandlung begrenzt [317;551]. Zumal eine kritische Bewertung von Therapieoptionen aufgrund der selbst in Zentren sehr kleinen Patientenzahl schwierig ist.

Weiterhin liegt die einzig mögliche kurative Therapie in einer chirurgischen Entfernung lokal begrenzter Karzinoide mit weitläufiger Lymphadenektomie unter Abschirmung mit Somatostatin-Analoga [63;112;317]. Eine Nachbetreuung sollte in jedem Fall lebenslang erfolgen [112]. Auch ein palliativer zytoreduktiver Eingriff kann, sogar bei vorhandener hepatischer Metastasierung, die Überlebenszeit signifikant verlängern (5-JÜL von 30% auf 61%) und die Symptomatik deutlich verbessern [112;158;493]. Entsprechend zeigte sich auch in der vorliegenden Studie ein signifikanter Überlebensvorteil einer R0- bzw. R1-Resektion gegenüber einem Eingriff mit makroskopisch sichtbaren Residuen.

Medikamentöse Therapien ermöglichen meist eine gute Behandlung der typischen Karzinoidsymptomatik, wirken allerdings nur begrenzt zytostatisch und nur selten zytoreduktiv auf die Erkrankung. Auch in der vorliegenden Arbeit fand sich, allerdings bei eingeschränkter Datenlage, kein Zusammenhang medikamentöser Behandlung mit der Überlebenszeit der Patienten. Eine, bei 80% der Patienten eingesetzte und symptomatisch hoch effektive (in 70–80% bzw. 100% der Fälle), Substanzgruppe bilden die Somatostatin-Analoga (SSA) Octreotid und Lanreotid, deren Wirksamkeit von einer Somatostatinrezeptor-Expression der Tumorzellen abhängt [112;372;493]. Langfristig werden Depotpräparate empfohlen [112]. Die SSA zeigen auch anti-angiogene, pro-apoptotische und Zellzyklusarrest auslösende Effekte mit einer durchschnittlichen Stabilisierung der Erkrankung von bis zu 4 Jahren bei 24-57% der Patienten [317;372]. Allerdings liegen die Regressionsraten unter 5% und es kommt nach einer begrenzten Zeit zu Wirkungsverlusten aufgrund von Tachyphylaxie oder Desensibilisierung [112;317;372]. Eine Studie mit fernmetastasierten NET erbrachte ein signifikant längeres Überleben durch eine Octreotid-Therapie [547]. Sonst kann Somatostatin-Analoga allerdings nur selten ein Einfluss auf die Überlebenszeit der Patienten nachgewiesen werden [493]. Interferone haben eine hohe symptomatische Ansprechrate (50-80%) und zeigen in 10-15% der Fälle eine Tumorreduktion für 12-26 Monate [112;317]. Allerdings

gelten sie wegen ihrer häufigen und starken Nebenwirkungen eher als „second-line“-Medikamente [112;372]. Die Ergebnisse von Kombinationsstudien mit SSA und Interferon sind inkohärent, zeigen aber teilweise eine positive Auswirkung auf das progressionsfreie Überleben (PFS, progression free survival) bzw. die Gesamtüberlebenszeit, jedoch keinen Regressionseffekt [112;317;372]. Rein symptomatisch wirken Serotoninantagonisten [172].

Der Nutzen adjuvanter Therapien ist fraglich [431]. Eine Vielzahl verschiedener Chemotherapeutika zeigt als Monotherapie in jejuno-ilealen NET nur geringe Effektivität bei der Tumorregression oder -stabilisation (<15% bzw. 30-50 %), die zudem weniger als ein Jahr andauert [372;493]. Auch Kombinationstherapien haben kaum mehr Erfolg, kommen aber dennoch palliativ z.B. mit Streptozotozin und 5-FU zum Einsatz [172;317]. Empfohlen werden Etoposide und Cisplatin jedoch nur bei schlecht-differenzierten NET [112;317;372]. Eine Kombination von Chemotherapeutika mit Somatostatin-Analoga wirkt stabilisierend und verlängert die mediane Überlebenszeit im Vergleich zur SSA-Monotherapie [247]. Dagegen zeigt eine Kombination mit Interferon keinen Nutzen [578].

Eine effektive, nebenwirkungsarme Option bietet die Peptidrezeptor-Radionuklid-Therapie (PRRT) mit radiogelabelten Somatostatin-Analoga, die allerdings nur in wenigen Zentren bei sonst therapierefraktären, symptomatischen Tumoren durchgeführt wird [112;132;254]. Sie wirkt gezielt über Somatostatinrezeptoren, die von 90 % der gastrointestinalen NET exprimiert werden [112]. Die in normaler Dosierung relativ sichere PRRT hat allerdings bei Überschreitung einer Schwellendosis toxische Effekte auf Niere und Knochenmark [112;578]. Genutzt werden heute vor allem Beta-Partikel, wie das hoch energetische Yttrium-90 (^{90}Y) und das kürzer strahlende Lutetium-177 (^{177}Lu), die mittels eines DOTA-Chelators an die SSA gekoppelt werden [254;578]. ^{90}Y-DOTA-Octreotid (DOTATOC), ^{90}Y-DOTA-Lanreotid, ^{90}Y-DOTA-Octreotat (Lutate) oder ^{177}Lu–DOTATATE bewirken bei fortgeschrittenen Karzinoiden eine Symptomlinderung, in 12–35% der Fälle eine partielle Tumorreduktion (PR, partial response) und bei 28–56% der Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung [112;254]. ^{177}Lu–DOTATATE scheint beispielsweise gegenüber Chemotherapie und SSA das PFS, sowie das Gesamtüberleben deutlich zu verbessern und verlängert die mediane Überlebenszeit gastroenteropankreatischer NET von 6 auf 10,5 Jahre [254].

Lebertransplantationen bieten bei ausgewählten Patienten einen kurativen Ansatz [503]. Hepatische Filiae werden jedoch meist operativ oder mittels Chemoembolisation, Kryo- und Radiofrequenzablation behandelt, allerdings sind diese Techniken immer mit Rezidiven verbunden [158;415;578]. Ein neues vielversprechendes Verfahren zur gezielten Behandlung von Lebermetastasen ist die SIRT (Selektive interne Radio-Therapie). Bei dieser hoch dosierten, lokalen Strahlentherapie werden mit ^{90}Y beladene Resin-Mikrosphären über einen trans-femoralen Zugang direkt in die jeweilige Leberarterie injiziert, die die Metastase versorgt, und das Gefäß dadurch embolisiert [238;239;259]. Die Radioembolisation bietet zwar keine kurative Therapie, verbessert aber nebenwirkungsarm die Lebensqualität und verlängert die Überlebenszeit [238]. Studien mit weit fortgeschrittenen, inoperabel hepatisch metastasierten NET zeigen eine partielle Tumorreduktion in 32-66% und eine komplette Regression in 2,7-18% der Fälle mit guter symptomatischer Linderung und einer medianen Überlebenszeit von 70 Monaten [223;236;239].
Zudem gibt es bereits einige neue Therapieansätze, wie z.B. BB-10901, einem Antigen gegen das neurale Zelladhäsionsmolekül CD56, das auf der Membran neuroendokriner Tumorzellen exprimiert wird [104]. Derzeit werden außerdem in klinischen Studien diverse Substanzen getestet, die auf verschiedene Wachstumsfaktoren, ihre Rezeptoren und die anschließenden Signalwege abzielen und zumindest partiell anti-angiogen wirken [317]. Allerdings kann auch hier nur bei wenigen Patienten eine objektive radiologische Tumorreduktion bestätigt werden [317].

Anti-angiogene Wirkstoffe

Viele der anti-angiogenen Substanzen wirken auf die VEGF-Liganden, -Rezeptoren oder ihre nachfolgenden Signalkaskade-Moleküle, wie Phospholipase C, PI3Kinase, AKT, mTOR, Ras, Src und MAPK [256;394]. Ihre Effektivität zur Behandlung maligner Erkrankungen wird derzeit in einer Vielzahl klinischer Studien an diversen Tumorentitäten ausgetestet. Aktuelle Phase-III-Studien mit Angiogenese-Inhibitoren befassen sich beispielsweise mit dem GIST, HCC, NSCLC, Pankreas-, Mamma-, Nierenzell-, Magen- und Prostatakarzinom (siehe auch http://www.cancer.gov/clinicaltrials/developments/anti-angio-table). Einige Präparate sind bereits zur Tumortherapie, z.B. des GIST, metastasierten Kolorektal-, Mamma- und Nierenzellkarzinoms, zugelassen worden [66;104]. Die Angiogenese-Inhibitoren erreichen jedoch meist eher eine Stabilisierung als eine Regression der Karzinome,

wirken aber beispielsweise in Kombination mit Chemotherapeutika oder Radiotherapie synergistisch [58]. Eine anti-angiogene Therapie normalisiert dabei vermutlich primär die Tumorvaskularisierung. Damit ermöglicht sie eine bessere Medikamentenverteilung, einen weniger aggressiven Phänotyp und höhere Chemosensitivität der malignen Zellen und verhindert ihre Streuung [58]. Da viele Tumorzellen selbst Angiogenese assoziierte Rezeptoren exprimieren, haben die Substanzen allerdings auch direkte zytostatische oder zytotoxische Effekte [66]. Nebenwirkungen sind beispielsweise Bluthochdruck, schlechte Wundheilung, Blutungen, RPLS (reversible posterior leukencephalopathy syndrome), thromboembolische Ereignisse, gastrointestinale Perforationen (Bevacizumab) und Nierentoxizität [225;289;437].

Das bekannteste und am besten erforschte Präparat ist der spezifische monoklonale Anti-VEGF-A-Antikörper Bevacizumab [317]. Er ist als Monotherapie zwar kaum effektiv, wurde aber in Kombination mit Chemotherapie für das fortgeschrittene Kolorektal-, Nierenzellkarzinom und NSCLC zugelassen [91;289;419;464]. Es existieren für dieses Medikament bereits einige Studien mit neuroendokrinen Tumoren. Eine Phase-II-Studie mit Bevacizumab in Kombination mit Oktreotid an 44 fortgeschrittenen Karzinoidtumoren (11 aus dem Ileum) führt bei 18% der Tumoren zu einer partiellen Regression, in 96% zu Progressionsfreiheit für 18 Wochen (68% mit Interferon) und zu einem medianen PFS von 16,5 Monaten im Vergleich zu 10,5 Monaten unter Sunitinib-, 7,8 Monaten unter Sorafenib- und 17,3 Monaten unter Everolimus-Therapie in anderen Studien [388;549;551]. Eine Kombination von Bevacizumab mit Temozolomide zeigt zwar in pankreatischen NET vielversprechende Ergebnisse, dagegen nicht in Karzinoiden [104]. Zusätzlich existieren klinische Tests an fortgeschrittenen Karzinoiden mit einer FOLFOX-Kombination und dem Bevacizumab-Ableger Panzem (Bevacizumab-2-methoxyestradiol) [104].

Eine weitere anti-angiogene Substanzklasse stellen die Tyrosinkinase-Inhibitoren Sunitinib malate, Sorafenib, Vatalanib, Imatinib mesylate, Vandetanib, Cediranib, Semaxanib und CP547632, die meist sehr breitgefächert wirken, partiell aber auch eine gewisse Spezifität gegenüber bestimmten Rezeptoren haben [104;114;394;419]. Sie besitzen im Vergleich zu Bevacizumab Vorteile durch eine orale Applikation oder ein größeres Wirkungsspektrum, verursachen aber auch schwerere Nebenwirkungen [394].
Sunitinib malate (SU11248; Sutent^{TM} Pfizer Inc.) wirkt als Tyrosinkinase-Inhibitor von VEGFR 1-3, PDGFR, RET ligand 1 (rearranged during transfection), c-Kit, FLT-3 (fms-

like tyrosinkinase) und CSF-1R (colony-stimulating factor receptor) und wurde bereits zur Monotherapie des metastasieren Nierenzellkarzinoms und des GIST zugelassen [78;114;256;258;317]. In einer Phase-II-Studie mit fortgeschrittenen neuroendokrinen Tumoren zeigt sich zwar im Vergleich zu pankreatischen NET eine relativ hohe Stabilisierungsrate (83% gegen 68%) bei gastrointestinalen Karzinoiden mit einem längeren PFS (42 versus 33 Wochen). Allerdings liegt die PR bei gerade 2% der Fälle (gegenüber 17% im pankreatischen NET) und auch Nachfolgeergebnisse konnten die Effektivität von Sunitinib für Karzinoide nicht sicher nachweisen [256;258]. Dagegen scheint seine zytostatische Wirkung in neuroendokrinen Pankreaskarzinomen signifikant zu sein [401].

Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®) ein weiterer oraler Tyrosinkinase-Inhibitor mit Wirkung auf PDGFR-b, FLT-3, RAF, c-KIT, FGFR-1, VEGFR-2 und -3 ist bereits als Monotherapie für das metastasierte Nierenzellkarzinom und das HCC zugelassen [49;104;317;437]. Eine Phase-II-Studie mit gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren weist allerdings nur auf einen bescheidenen Effekt (PR bei 7% gegenüber 17% bei pankreatischen NET) mit einem medianen progressionsfreien Überleben von 7,8 Monaten bei Karzinoiden (11,9 bei pankreatischen NET) hin [549].

Vatalanib (PTK787/ZK222584) hemmt die Tyrosinkinase von VEGFR 1-3 und in höherer Konzentration auch von PDGFR, Flt-3 und c-KIT [104;317]. Es wird derzeit an einigen Tumorentitäten, unter anderem auch an neuroendokrinen Tumoren, getestet und führt in Kombination mit Chemotherapie bei Kolorektalkarzinomen zu einem längeren progressionsfreien Überleben [104;289;419].

Imatinib mesylate (STI-571, Gleevec® Novartis) inhibiert die Tyrosinkinasen von ABL, PDGFR and c-Kit und ist für die Behandlung des GIST zugelassen, zeigt aber in neuroendokrinen Tumoren kaum Wirkung (4% PR) dafür jedoch deutliche Nebenwirkungen [104;256;419].

Die mTOR-Inhibitoren Sirolimus (Rapamycin), seine Derivate Temsirolimus und Everolimus hemmen als anti-angiogene Wirkstoffgruppe die Threoninkinase mTOR (mammalian Target of Rapamycin), die in der intrazellulären PI3K/AKT/mTOR-Signalkaskade von VEGF- und IGF-Rezeptoren in die Stimulation des Zellzyklus involviert ist [104;256;317]. Eine Phase-II-Studie mit Temsirolimus zeigt einen zytoreduktiven Effekt bei 5% der Karzinoide und 7% der Inselzelltumore mit einem medianen PFS von 6 Monaten und einer 1-JÜL-Rate von 72% [104;317].

Everolimus (RAD001) bewirkt in einer Phase-II-Studie in Kombination mit einem Depot-Oktreotid eine partielle Regression bei 13% der eingeschlossenen Karzinoide (15% der Inselzelltumore), dabei sind insgesamt 50% der Tumore stabil und die mediane progressionsfreie Überlebenszeit liegt bei 17,3 Monaten für Karzinoidpatienten (9,8 bei pankreatischen NET) [388;550]. In der RADIANT-1 Studie mit fortgeschrittenen progredienten NET des Pankreas zeigt sich bei Kombination mit einem Depot-Oktreotid im Vergleich zu einer Everolimus-Monotherapie ein PFS von 16,7 Monaten gegenüber 9,7 Monaten, eine PR in 4,4% gegenüber 9,6% der Fälle und eine Tumorstabilisierung bei 80% der Patienten gegenüber 67,8% [548]. Aktuell finden multizentrische Phase-III-Studien mit Patienten statt, deren neuroendokrine Erkrankung innerhalb eines Jahres Progression zeigte. RADIANT-2 kombiniert bei fortgeschrittenen Karzinoiden Everolimus mit einem Depot-Oktreotid und vergleicht sie mit Octreotid LAR plus Placebo. RADIANT-3 betrachtet die Auswirkungen einer Kombination mit der besten unterstützenden Therapie bei fortgeschrittenen NET des Pankreas gegenüber der Gabe eines Placebos zusammen mit der besten unterstützenden Therapie [548].

Zusätzlich gibt es noch einige andere anti-angiogene Therapieansätze in neuroendokrinen Tumoren. Allerdings zeigt der EGFR-Inhibitor Gefitinib nur wenig Effekt; ebenso wirkt das Kollagenfragment Endostatin zwar zytostatisch (80%) aber nicht zytoreduktiv [104;256]. Thalidomid behindert die Aktivität von basalem FGF und VEGF-A, zeigt in Monotherapie jedoch keine Wirkung in NET. In Kombination mit Temozolomide, allerdings unter starken kumulativen Nebenwirkungen, ergibt sich eine partielle radiologische Regression bei 45% der endokrinen Pankreaskarzinome und 7% der Karzinoide [104].
Zusammenfassend sind die Regressionsraten in gastrointestinalen fortgeschrittenen NET infolge anti-angiogener Substanzen, entsprechend der hier vorgestellten Ergebnisse, bis dato generell niedrig. Auch der zytostatische Effekt ist aufgrund der meist heterogenen Zusammenfassung verschiedener neuroendokriner Tumorentitäten, der mangelnden Klarheit in der Definition einer Tumorstabilisierung und der häufig fehlenden Progression der Tumore vor Eintritt in die Studie vorsichtig zu beurteilen [104;256]. Zudem ist eine Stabilisierung der Erkrankung schwer von der typisch geringen Proliferation der Tumore zu trennen [256]. Dennoch könnte eine Kombinationstherapie mit Bevacizumab auch für Patienten mit einem fortgeschrittenen Ileumkarzinoid einen gewissen Nutzen bieten [549;551]. Die RADIANT-Studien werden die Wirksamkeit von Everolimus in neuroendokrinen Tumoren klären [548].

MMP-Inhibitoren

Die Expression von Matrixmetalloproteinasen ist in vielen Tumorentitäten hoch reguliert und häufig auch mit einer schlechten Prognose und einem fortgeschrittenen Tumorstadium verbunden, insofern liegt eine therapeutische Nutzung nahe [127]. Synthetische MMP-Inhibitoren (MMPI) haben zumeist auch einen hemmenden Effekt auf das Tumorwachstum und die Metastasierung im Mausmodell [576].

Die ausschließlich parenteral verabreichbaren Substanzen der ersten Generation (Batimastat, BB94 und GM-6001 Ilomostat) wurden schnell von der zweiten Generation ersetzt [367]. Zu ihnen zählen Marimastat (BB2516, MMP-1,-2, -3, -7 und -9 Inhibition), Tanomastat (BAY12-9566, MMP-2, -3 und -9 Inhibition), Prinomastat (AG3340, MMP-2, -3, -9 und -13 Inhibition), BMS-275291 (Breitspektrum-MMPI), MMI270 (CGS27023A, Breitspektrum-MMPI) und das Tetracyclinderivat COL-3 (MMP-2 und -9 Inhibition) [72;342;576]. Allerdings wurden die hoffnungsvollen Erwartungen in den meisten klinischen Studien enttäuscht. Sowohl MMPIs mit einem breiten Hemmspektrum, als auch solche, die eine Teilselektivität aufweisen, zeigten in extensiven klinischen Phase-III-Studien mit fortgeschrittenen Krebserkrankungen fast durchgängig weder als Monotherapie, noch in Kombination klinische Effektivität [72;367;576].
Immerhin scheint Marimastat sowohl im frühen, als auch im fortgeschrittenen Magenkarzinom tendenziell das Überleben positiv zu beeinflussen. In inoperablen Kolorektalkarzinomen mit Lebermetastasen bietet es sogar einen signifikanten Überlebensvorteil, der allerdings mit dem muskuloskeletalen Syndrom, der häufigsten Nebenwirkung von Chelat-MMPIs, assoziiert ist [72;576]. Tanomastat hingegen verschlechterte sogar die Prognose im SCLC gegenüber dem Placebo [72;367;576].

Die mangelnde therapeutische Effektivität der MMPIs lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass die MMPs kontextabhängig nicht nur pro-kanzerogen, sondern auch anti-kanzerogen wirken [127;301]. Die Proteasen scheinen in frühen Schritten der Krebsentstehung, wie der lokalen Invasion und der Mikrometastasierung, wichtig zu sein und könnten ihren Einfluss nach der Etablierung von Metastasen einbüssen [576]. Zudem ist die Wirkung der MMPs vermutlich nicht nur vom Tumorstadium, sondern auch vom Genotyp abhängig [127].

Overall et al. definierten exklusiv MMP-1, -2 und -7 als vielversprechende Ziele der Krebstherapie, wohingegen MMP-3, -8 und -9, aufgrund der nachteiligen oder sogar lebensgefährlichen Auswirkungen ihrer Inhibition, als „Antiziele“ kategorisiert wurden [367]. Problematisch ist dabei die starke Homologie der MMPs untereinander, die die Entwicklung von effektiv spezifischen MMPIs der dritten Generation schwierig macht [127]. MMPIs könnten jedoch mit der entsprechenden Substratspezifität, in Kombination mit anderen Therapeutika und im richtigen Tumorstadium, durchaus das Potential zu einer effektiven adjuvanten Krebstherapie besitzen [72;127;576].

Eine klinische Studie mit fortgeschrittenen Ileumkarzinoiden wäre allerdings wenig erfolgversprechend, da die Expression der Matrixmetalloproteinasen mit dem Tumorprogress abfiel und niedrige Expressionswerte von MMP-2 sogar mit einem kürzeren Überleben assoziiert waren. Ein möglicher Einsatz in Frühstadien erscheint, aufgrund der meist sehr späten Diagnose, nicht wirklich praktikabel. Eine Ausnahme bildete allerdings MMP-13, für das ein spezifischer Inhibitor bereits entwickelt wurde [387]. Die Kollagenase-3 wurde in metastasierten Ileumkarzinoiden signifikant stärker exprimiert, zeigte aber keine Assoziation zum Überleben.

VMAT-1

Zur therapeutischen Nutzung von VMAT-1 bei EC-Zellkarzinoiden gibt es bereits einige Ansätze. Radiojodiertes Meta-Jodobenzylguanidin (MIBG), bei der Szintigraphie zur Darstellung Amin-produzierender Tumore genutzt, wird als Substrat von VMAT-1 und -2 in den Granula enterochromaffiner Zellen akkumuliert und könnte so bei Ileumkarzinoiden radiotherapeutisch wirken [201]. Eine weitere Möglichkeit wäre eine gegen VMAT-1 gerichtete, T-Zell-vermittelte Immunotherapie [510].

4.8. Expressionsverlust mit Karzinoidprogress und mögliche Ursachen

Der Expressionsverlust in fortgeschritteneren Karzinoiden im Vergleich zu kleineren, weniger invasiven bzw. nur lymphatisch metastasierten Primaren entsprach, ebenso wie die positive prognostische Potenz von MMP-2 und VEGF-B, nicht dem antizipierten Ergebnis. Dennoch konnte diese Tendenz hier fast durchgängig und zusätzlich auch bei anderen Parametern, wie Integrinen (Daten nicht gezeigt), beobachtet werden. Von einer grundsätzlich anti-kanzerogenen Wirkung dieser Faktoren auf Ileumkarzinoide auszugehen, führt deutlich zu weit. Dennoch könnte man vor dem Hintergrund des aggressivitätssteigernden Effektes hypoxischer Zustände auf Tumoren über einen möglichen malignitätshemmenden Einfluss der vaskulären Wachstumsfaktoren durch eine bessere Gefäßversorgung spekulieren [58]. Die TIMPs besitzen dagegen generell deutlich hemmende Effekte auf die Entstehung und Progression von Tumoren, allerdings wurden auch für diese Proteine paradoxe stimulierende Einflüsse identifiziert [206;460]. Entsprechend wirken die MMPs nicht ausschließlich pro-kanzerogen, sondern auch anti-kanzerogen [127;301]. Dabei ist die jeweilige Wirkung kontextabhängig, beispielsweise vom Stadium des Tumorprogresses, und möglicherweise auch vom Genotyp [127].

Die Expressionsminderung in den Karzinoiden könnte möglicherweise bereits auf genetischer Ebene ihren Ursprung haben. Fokale Deletionen und starke Amplifikation scheinen zwar in Ileumkarzinoiden selten zu sein [257]. Allerdings wird in dieser Tumorentität im Gegensatz zu neuroendokrinen Pankreaskarzinomen und Karzinoiden anderen Ursprungs häufig ein weitgehender oder vollständiger Verlust des Chromosoms 18, sowie von Teilen der Chromosomarme 9p, 11q und 16q beschrieben [257;520]. Die raren Sequenzgewinne betreffen vor allem Chromosom 4, 7, 5, 20 und den Arm 14q [257;272;520]. Diese Veränderungen führen zu einem divergierenden Expressionsverhalten. Zusätzlich sind die Gene einiger hier untersuchter Faktoren in den entsprechenden Bereichen lokalisiert, wie z.B. MMP-2 (16q), MMP-9 (20q), MMP-13 (11q), VEGF-B (11q), VEGF-C (4q), VEGFR-2 (4q) und VEGFR-3 (5q) [366;369;419;509;511]. Die relativ häufig betroffene fokale Region auf Chromosomarm 14q kodiert zudem das anti-apoptotische Protein DAD1 [257]. Dies deutet auf eine ansteigende Malignität mit zunehmenden genetischen Alterationen hin. Auffälliger Weise kann der Verlust großer genetischer Regionen und der moderate Gewinn sowohl im

Primar als auch in den zugehörigen Metastasen nachgewiesen werden [257]. Dies könnte darauf hinweisen, dass solche Veränderungen früh in der Karzinoidpathogenese auftreten und selbst diese geringen Basenpaargewinne einen starken Einfluss auf das Zellverhalten dieser Tumorentität haben [257]. Somit könnten verschiedene Subtypen der EC-Zellkarzinoide existieren, deren unterschiedlicher genetischer Hintergrund zu divergierender Tumorbiologie und Aggressivität führt. Allerdings konnten Studien die sich mit der genetischen Alteration befassen, kaum Assoziationen zu klinischen oder histopathologischen Daten feststellen [257;487]. Immerhin ist der Verlust von Chromosom 18 möglicherweise mit dem Tumorwachstum, wenn auch mit einer geringeren Tumorgröße, verknüpft [520]. Bei der Subtypentheorie stellt sich zudem die generelle Frage, ob die Fähigkeit zur Metastasierung nur einzelne selektierte Zellen oder den gesamten Tumor betrifft und somit ein grundsätzlich erhöhtes Aggressionspotenzial zu einer gesteigerten Malignität und schlechteren Prognose führt [11].

Allerdings erscheint hier eine Änderung des Expressionsverhaltens im Zuge einer Tumorprogression durchaus wahrscheinlicher, als eine Verhinderung der Progression durch höhere Expression. Zusätzlich betraf der Expressionsverlust auch den spezifischen EC-Zellmarker VMAT-1. Somit könnte dieses Phänomen, entsprechend der These von Eissele et al. [107], auch auf einem Entdifferenzierungsprozess infolge zunehmender Malignität gründen. Denn Ileumkarzinoide bleiben typischerweise, wie auch in dieser Studie, trotz starker Aggressivität und weit fortgeschrittenem Tumorprogress histologisch gut differenziert. Möglicherweise zeigten die hier untersuchten Faktoren also Veränderungen der Zelldifferenzierung auf einer anderen, zellmorphologisch nicht offensichtlichen Ebene und könnten als Differenzierungsmarker von diagnostischem und prognostischem Nutzen sein. Eine erforderliche, kritische Untersuchung dieser Theorie mithilfe von etablierten, spezifischen Differenzierungsmarkern, wie z.B. E- oder N-Cadherin [371;391;579], CD99 [13] oder CDX2 [346] bzw. Notch1 [260;337;371], die beide als Marker für die gastrointestinale neuroendokrine Zelldifferenzierung gelten, wurde indes im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Im Kontrast zu den hier vorgestellten Ergebnissen werden allerdings einige der untersuchten Parameter primär mit einem entdifferenzierenden Einfluss im Rahmen der EMT und infolgedessen mit einer Zunahme von Malignität in Zusammenhang gebracht. MMP-2 und -9 induzieren durch die Abspaltung von E-Cadherin den Übergang

epithelialer Zellen zu einem mesenchymalen Phänotyp [105;509]. Außerdem ist MMP-11 ebenso mit der EMT assoziiert [6;452], wie VEGF-A und –B über VEGFR-1 [541;546]. Dagegen gilt TIMP-2 als positiver Differenzierungsmarker [384;462] und auch die Expression von TIMP-1 und möglicherweise von TIMP-3 sind mit einer besseren Differenzierung assoziiert [148;299;460]. In diesem Kontext ist zudem die häufig auftretende Korrelation einer höheren Gefäßdichte mit einer besseren Differenzierung bzw. niedrigeren Malignität in gastrointestinalen neuroendokrinen Tumoren zu erwähnen, die mit der These einer physiologisch typischen angiogenen Eigenschaft neuroendokriner Zellen verknüpft wird [392]. Dies könnte sich aufgrund des hier vorhandenen direkten Zusammenhangs der MVD mit der Expression der VEGF-Rezeptoren und der meisten Liganden auch auf diese Parametergruppe adaptieren lassen.

Allerdings spricht die wahrscheinliche Überexpression bzw. de novo Expression von VEGF-A, VEGF-B, VEGFR-1 und VEGFR-2 in den Ileumkarzinoiden im Vergleich zu normalen EC-Zellen [262;315] eher für einen induzierten Prozess in der Frühphase der Tumorentstehung, der die malignen EC-Zellen zu pro-angiogener Expression veranlasst und dadurch den angiogenen „Switch“ triggert [67;162;421]. Dem entspräche auch die zunächst mit zunehmendem Tumordurchmesser gesteigerten MVD. Der nachfolgende Abfall der Gefäßdichte in großen Karzinoiden könnte in diesem Sinne für eine Abnahme induzierender Signale sprechen. Beispielsweise könnte Hypoxie nach Etablierung einer Vaskularisierung in den langsam wachsenden neuroendokrinen Tumoren eine geringere Rolle spielen.

Entsprechend sind auch wichtige andere karzinogene Eigenschaften der untersuchten Parameter in der frühen Tumorgenese angesiedelt. So sind die MMPs vermutlich wichtig bei der lokalen Invasion und Mikrometastasierung, könnten aber möglicherweise nach Etablierung der Metastasen nicht weiter erforderlich sein [576]. MMP-11 gilt beispielsweise als essentiell für das Frühstadium der Entstehung von Primärtumoren, scheint aber keinen Einfluss auf das Wachstum, die invasive oder metastatische Potenz bereits etablierter, palpabler Tumoren zu haben [16;96;348;349]. Zudem ist auch die EMT ein sehr früher Prozess der Karzinogenese [34;105;163;546]. Insofern könnte die allgemeine Expressionsminderung auf mangelnde Induktionssignale im progredienten Karzinoidstadium zurückgehen.

Möglicherweise ist dies allerdings auch ein Relativierungsphänomen im Zuge einer typischen pauci-zellulären Fibrosierung von fortgeschrittenen EC-Zelltumoren [242;346].

Leider konnte letztendlich keine der hier aufgestellten Theorien über einen möglichen absoluten Expressionsverlust aufgrund mangelnder Induktionssignale oder einer gesenkten Funktionalität im Rahmen einer Entdifferenzierung, eine relative Expressionsminderung bei zunehmender Fibrosierung oder die Existenz verschiedener Karzinoidsubgruppen, deren EC-Zellursprung sich von Anfang an in seiner Differenzierung und seiner malignen Potenz unterscheidet, geklärt werden. Allerdings werden sie, ebenso wie die hier herausragende positive Korrelation des Tumorprogress mit MMP-13 und der ITL, dem einzigen negativen prognostischen Marker in dieser Studie, Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein.

5. Zusammenfassung

Ileumkarzinoide sind langsam wachsende, gut differenzierte neuroendokrine Tumore (NET), die sich aus Serotonin produzierenden enterochromaffinen (EC) Zellen des Dünndarms entwickeln [578]. Aufgrund ihrer späten symptomatischen Manifestation und schwer zugänglichen Lokalisation werden sie meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium oder zufällig diagnostiziert. Die Forschungsdaten über die Karzinogenese dieser sehr seltenen Tumorentität sind bis heute begrenzt und die Möglichkeiten zur gezielten Behandlung und Heilung der Ileumkarzinoide sind, abgesehen von chirurgischer Resektion, noch immer insuffizient [317;493]. Konsekutiv versterben die meisten Patienten mit einem fortgeschrittenen Karzinoid trotz der Indolenz dieser Tumore in Folge der Erkrankung [551].

Diese Arbeit beschäftigte sich zum einen mit der diagnostischen Potenz des Monoamintransporters VMAT-1 und des Proliferationsindexes KI-67. Zum anderen fokussierte sie sich auf ausgesuchte Matrixmetalloproteinasen (MMP) und zugehörige Inhibitoren (TIMP), sowie die Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGF) und ihren Rezeptoren (VEGFR) und deren Assoziation sowohl zur Angiogenese und Lymphangiogenese, als auch zu Wachstum, Invasion, Metastasierung und Prognose der Ileumkarzinoide. Ziel war es dabei, neue Erkenntnisse über die Tumorbiologie zu gewinnen und mögliche prognostische Faktoren, sowie potentielle therapeutische Ansatzpunkte zu identifizieren.

Zu diesem Zweck wurden mittels semiquantitativer real-time RT-PCR die relative Expression von VMAT-1, den MMPs, TIMPs, VEGF-Liganden und –Rezeptoren in 25 primären Ileumkarzinoiden, jeweils zugehöriger Ileummukosa, lymphatischen und hepatischen Metastasen gemessen, immunhistochemische Färbungen von VMAT-1, MIB-1, CD-31 und LYVE-1 angefertigt, der KI-67-Index, die mikrovaskuläre Dichte (MVD) und die intratumorale und peritumorale Lymphgefäßdichte (ITL, PTL) evaluiert und diese Parameter mit klinischen und histopathologischen Daten korreliert.

Der KI-67-Index ist ein zellulärer Marker für Proliferation [507]. Er dient in jejuno-ilealen Karzinoiden zur Evaluation des Tumorgrades und gilt dort als prognostischer Faktor [317;411]. Hier zeigte sich jedoch keinerlei Zusammenhang histopathologischer Parameter oder der Überlebenszeit mit den extrem niedrigen Indexwerten dieser kaum proliferierenden Tumorentität [86]. Somit erscheint zumindest in dieser Studie der prognostische Nutzen dieses Markers in Ileumkarzinoiden fraglich.

VMAT-1 ist Bestandteil der Membran von Sekretgranula und im Gastrointestinaltrakt fast exklusiv auf EC-Zellen beschränkt [106;110]. Erwartungsgemäß war der Transporter in den Ileumkarzinoiden extrem hochreguliert und konnte in Gewebe ohne enterochromaffinen Ursprung nicht nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich ein signifikanter Expressionsverlust in fortgeschrittenen Karzinoiden. Dies ist möglicherweise Anzeichen eines Entdifferenzierungsprozesses und zunehmender Malignität. Somit könnte VMAT-1 nicht nur als diagnostischer Parameter dienen [201], sondern auch prognostischen Wert besitzen [107].

MMPs sind eine große Familie von Proteasen, die Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) und viele andere Proteine spalten und somit das Zellverhalten auf vielfältige Weise regulieren können [334;459]. TIMPs wirken dagegen nicht nur hemmend auf MMPs, sondern besitzen auch zahlreiche davon unabhängige Funktionen [206]. Dadurch ist das System der MMPs und TIMPs in eine Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse involviert [556] und beeinflusst die Karzinogenese auf diversen Ebenen [265]. Die hier untersuchten Metalloproteinasen (MMP-2, -7, -9, -11, -13) und Inhibitoren (TIMP-1, -2, -3) konnten, abgesehen von MMP-7, alle in den Tumoren nachgewiesen werden. Allerdings fiel auch ihre Expression fast durchgängig in fortgeschrittenen Primaren ab. MMP-2 und TIMP-3 erwiesen sich sogar als positiv prognostisch für die Überlebenszeit. Einzig MMP-13 zeigte eine Expressionssteigerung mit Progression der Ileumkarzinoide.

VEGF-Liganden induzieren mittels ihrer Rezeptoren sowohl unter physiologischen, als auch unter pathologischen Konditionen das Wachstum von Blut- und Lymphgefässen [481]. Allerdings wirkt ihre mitogene, chemotaktische und anti-apoptotische Aktivität auch auf diverse Zellen nicht-endothelialen Ursprungs, da eine Expression der VEGF-Rezeptoren weitverbreitet und auch in vielen Tumorzellen zu finden ist [58;122;468]. In den Ileumkarzinoiden konnte eine Expression der VEGF-Liganden und -Rezeptoren nachgewiesen werden. Diese Werte waren mit Ausnahme der VEGF-D-Expression positiv mit der MVD verknüpft. Allerdings stand keiner der Wachstumsfaktoren oder Rezeptoren, inklusive der generell lymphangiogenen VEGF-C/VEGF-D/VEGFR-3-Achse [473], mit der PTL im Zusammenhang. Konträrer Weise war die ITL sogar invers mit VEGF-B, VEGF-C und VEGFR-2 assoziiert. Zusätzlich zeigte sich auch bei diesen Parametern größtenteils ein Abfall der Expressionswerte mit der Tumorprogression und VEGF-B-Expression korrelierte mit einer längeren Überlebenszeit.

Bei Untersuchungen zur Lymphgefäßdichte werden meist, wie auch in dieser Studie, intratumorale und peritumorale Lymphgefäße unterschieden [205]. Die in den Ileumkarzinoiden fehlende Korrelation der ITL und PTL mit dem primär auf Lymphgefäßen exprimierten VEGFR-3 hatte ihre Ursache vermutlich in der signifikant niedrigeren Anzahl der lymphatischen Gefäße gegenüber den Blutgefäßen, die im Zuge einer Neovaskularisierung diesen Rezeptor ebenfalls exprimieren [205;377]. Der mangelnde bzw. inverse Zusammenhang von VEGF-C und –D mit der Lymphgefäßdichte könnte entweder für eine lymphangiogene Rolle in einem sehr frühen Tumorstadium, die im Laufe der Karzinoidprogression an Einfluss verliert, oder für ein funktionelles Vorherrschen anderer lymphangiogener Wachstumsfaktoren sprechen [490]. Die PTL war mit keinem klinischen oder histopathologischen Parameter assoziiert. Dagegen war die intratumorale Lymphgefäßdichte der einzige Faktor in dieser Studie, der proportional zur Tumoraggressivität anstieg, mit einer kürzeren Überlebenszeit verknüpft war und somit in den ilealen EC-Zellkarzinoiden als negativer prognostischer Marker fungierte.

Neuroendokrine gastrointestinale Tumore sind typischer Weise sehr gefäßreich [84;551] und Tumorangiogenese gilt im Allgemeinen als prognostisch negativ [563]. Indes ist in EC-Zelltumoren die MVD häufig invers mit der Malignität verknüpft [262;392] und Poncet et al. vertreten die These, dass eine starke Angiogenese eine typische Eigenschaft neuroendokriner Zellen und ein Absinken der MVD im Laufe des Tumorprogresses als Entdifferenzierungszeichen gastrointestinaler NET zu werten sei [392]. Dagegen korrelieren Zhang et al. die Angiogenese in Karzinoiden unterschiedlichen Ursprungs negativ mit der Prognose [570]. In den hier untersuchten Ileumkarzinoiden zeigte sich jedoch eine Tendenz zu niedrigerer MVD in fortgeschrittenen Tumoren. Fehlende Expression von VEGF-A, VEGFR-1 und –2 in normalen EC-Zellen [262] spricht allerdings für eine Überexpression der vaskulären Faktoren in einem frühen Karzinoidstadium mit konsekutivem angiogenen „Switch“ und einen Verlust der angiogenen Potenz im Zuge der Karzinoidprogression.

Die Expression der untersuchten Parameter war fast durchgängig invers mit der Malignität korreliert. Lediglich MMP-13 wurde in fortgeschrittenen Karzinoiden stärker exprimiert. Ob der Expressionsabfall in fortgeschrittenen Ileumkarzinoiden beispielsweise eine Folge eines absoluten Funktionalitätsverlustes im Rahmen einer Entdifferenzierung oder mangelnder Induktionssignale bzw. einer relativen Expressionsminderung bei zunehmender Fibrosierung ist oder Zeichen der Existenz verschiedener Karzinoidgruppen, deren EC-Zellursprung sich von Anfang an in seiner Differenzierung und seiner malignen Potenz unterscheidet, konnte hier letztendlich nicht geklärt werden. Allerdings konnten die vaskulären Wachstumsfaktoren, wenn auch nicht mit der Lymphangiogenese, so doch mit der Angiogenese in Ileumkarzinoiden direkt assoziiert werden. MMP-2, TIMP-3 und VEGF-B erwiesen sich als positiv, die ITL als negativ prognostisch für die Überlebenszeit der Patienten.

Geräte, Verbrauchsmaterialien und Herstellerfimen

Geräte und Verbrauchsmaterial		Herstellerfirmen
Abzug		Köttermann
Autoklav		KSG
Färbemodul	Ventana BenchMark	Ventana Medical Systems
Gewebeeinbettautomat	Pathcentre	Shandon
Kühlschank 4-8℃		Bosch
Gefrierschrank -20 ℃		Liebherr
Gefrierschrank -80 ℃		GFL
Stickstofftank	MVE	German-cryo
Eismaschine		Scotsman
Laborfeinwaage		Sartorius Analytic
		Kern
Magnetrührer	heizbar	IKA
Mikroskope	IDO3	Zeiss
	Imager.A1 Axio	Zeiss
Mikroskop-Kamera	Axio Cam HRc Color	Zeiss
Mikrowellengerät		Siemens
PCR-Thermocycler	Primus 96Plus	MWG-Biotech
	Biometra Tgradient	Biometra
Taq Man PCR-Reader	ABI Prism 7700 Sequence Detector	Perkin Elmer
pH-Meter		Bender & Hobein
		WTW
pH-Elektrode		Neolab
Photometer		Eppendorf
Rotationsmikrotom	HM 355 S	Microm
Sterilbank	mit S2-Zertifikat und Zubehör	Clean Air
		BDK
Votrex-Schüttler		IKA
		Bender & Hobein
Wasserbad	Schüttelwasserbad	GFL
Zellkulturbrutschrank	nicht begasbar	Heraeus
	begasbar	Heraeus
Zentrifugen	Tischzentrifugen	Hettich
		Eppendorf
		Labnet
	Tisch-Kühlzentrifugen	Hettich
		Eppendorf
	Zellkulturzentrifuge	Hettich
	Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Reaktionsgefäßständer		Neolab
Glasgeräte	Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Messzylinder, Glasflaschen mit Schraubverschluss etc.	VWR
Neubauer-Zählkammer	Tiefe: 0,1mm/ 0,0025 mm²	P. Marienfeld

Geräte und Verbrauchsmaterial		Herstellerfirmen
Glas-Pasteurpipetten	Volac	Poulten & Graf
Kolbenhubpipetten	mit Zubehör	Eppendorf
		ABIMED
Pipettenspitzen		Eppendorf
	Safe seal Tips professional 10µl, 100µl, 1000µl	Biozym Scientific
Einmalküvetten	halbmikro 1,5 ml	Brand GmbH
Einmalspritzen	1, 5, 10, 20 ml	Codan Medical
Hydrophober Barriere Stift	Fettstift	Vector
Kryoröhrchen	1,5 ml	Nalgene
Objektträger	Superfrost	Menzel-Gläser
PCR-Reaktionsröhrchen	0,2 ml	Biozym Scientific
Reaktionsröhrchen	Safe Lock 0,5; 1,0; 2,0 ml	Eppendorf
Skalpellklingen		Aesculap
Stiltupfer	steril	Lohmann & Rauscher
Untersuchungshandschuhe	Latex	Kimberly-Clark
UV-Küvetten	steril, pyrogenfrei, 50-2000µl	Eppendorf
Verschlussfolie	Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
96-Well-Abdeckplastik	ABsolute QPCR Seal	ABgene
96-Well-Platten	Thermofast 96 Detection Plate AB-1100	ABgene
Zellkulturflaschen mit Membranverschluss	Falcon™ 12,5; 25; 75 cm²	BD Biosciences
Zentrifugationsröhrchen	Falcon™, konisch 15, 50 ml	BD Biosciences

Herstellerfirmen

ABgene	Epsom, Surrey	Großbritannien
ABIMED GmbH	Langenfeld	Deutschland
Aesculap AG	Tuttlingen	Deutschland
Apotheke des Klinikums rechts der Isar	München	Deutschland
AppliChem GmbH	Darmstadt	Deutschland
Applied Biosystems	Foster City, CA	USA
BD Becton, Dickinson and Company Biosciences	Franklin Lakes, NJ	USA
BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH	Stuttgart	Deutschland
Beckman Coulter, Inc.	Brea, CA	USA
Bender & Hobein AG	Zürich	Schweiz
Biometra GmbH	Göttingen	Deutschland
BIOTREND Chemikalien GmbH	Köln	Deutschland
Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, Hessen	Deutschland
Bosch GmbH	Stuttgart	Deutschland
Brand GmbH	Wertheim	Deutschland
Cambrex Corporation	East Rutherford, NJ	USA
Clean Air Produkts	Minneapolis, MN	USA
CODAN Medizinische Geräte GmbH	Lensahn	Deutschland
Dako ChemMate	Glostrup	Dänemark
Dianova GmbH	Hamburg	Deutschland

Eppendorf AG	Hamburg	Deutschland
Fluka/Sigma-Aldrich	Steinheim	Deutschland
Fresenius SE	Bad Homburg	Deutschland
German-cryo GmbH	Jüchen	Deutschland
GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH	Burgwedel	Deutschland
Gibco/Invitrogen	Carlsbad, CA	USA
Heraeus	Hanau	Deutschland
Hettich GmbH	Tuttlingen	Deutschland
IKA Labortechnik Janke & Kunkel GmbH	Staufen	Deutschland
Invitrogen Corporation	Carlsbad, CA	USA
Kern & Sohn GmbH	Balingen-Frommern	Deutschland
Kimberly-Clark Professional	Koblenz	Deutschland
Köttermann GmbH	Uetze/Hänigsen	Deutschland
KSG Sterilisatoren GmbH	Olching	Deutschland
Labnet International, Inc.	Edison, NJ	USA
lgc Promochem GmbH	Wesel	Deutschland
Liebherr-International Deutschland GmbH	Biberach a.d. Riss	Deutschland
Lohmann & Rauscher GmbH	Neuwied	Deutschland
medite GmbH	Burgdorf	Deutschland
Menzel-Gläser	Braunschweig	Deutschland
Merk Chemicals	Darmstadt	Deutschland
Microm/Thermo Fisher Scientific	Rochester, NY	USA
MWG Biotech AG	Ebersberg	Deutschland
Nalgene/Thermo Fisher Scientific	Rochester, NY	USA
Neolab GmbH	Heidelberg	Deutschland
P. Marienfeld GmbH	Lauda-Königshofen	Deutschland
Pechiney Plastic Packaging Company	Chicago, IL	USA
PerkinElmer	Waltham, MA	USA
Poulten & Graf GmbH	Wertheim	Deutschland
Qiagen GmbH	Hilden	Deutschland
R&D Systems	Minneapolis, MN	USA
Roche AG	Basel	Schweiz
Rockland Immunochemicals, Inc.	Gilbertsville, PA	USA
Roth GmbH	Karlsruhe	Deutschland
Sartorius Analytic	Göttingen	Deutschland
Scotsman Ice Systems	Vernon Hills, IL	USA
Shandon/Thermo Fisher Scientific	Rochester, NY	USA
Siemens AG	München	Deutschland
Sigma-Aldrich	Steinheim	Deutschland
Vector Laboratories, Inc.	Burlingame, CA	USA
Ventana Medical Systems	Tucson, AZ	USA
VWR International GmbH	Wien	Österreich
WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH	Weilheim	Deutschland
Zeiss AG	Göttingen	Deutschland

Literaturverzeichnis

(1) Aase K, Lymboussaki A, Kaipainen A, Olofsson B, Alitalo K, Eriksson U: Localization of VEGF-B in the mouse embryo suggests a paracrine role of the growth factor in the developing vasculature. Dev Dyn 1999; 215(1):12-25.

(2) Aase K, von Euler G, Li X, Ponten A, Thoren P, Cao R, Cao Y, Olofsson B, Gebre-Medhin S, Pekny M, Alitalo K, Betsholtz C, Eriksson U: Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. Circulation 2001; 104(3):358-364.

(3) Abdelrahim M, Baker CH, Abbruzzese JL, Sheikh-Hamad D, Liu S, Cho SD, Yoon K, Safe S: Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-1 expression by specificity proteins 1, 3, and 4 in pancreatic cancer cells. Cancer Res 2007; 67(7):3286-3294.

(4) Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA: Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(2):548-553.

(5) Ahlman H, Nilsson: The gut as the largest endocrine organ in the body. Ann Oncol 2001; 12 Suppl 2:S63-S68.

(6) Ahmad A, Hanby A, Dublin E, Poulsom R, Smith P, Barnes D, Rubens R, Anglard P, Hart I: Stromelysin 3: an independent prognostic factor for relapse-free survival in node-positive breast cancer and demonstration of novel breast carcinoma cell expression. Am J Pathol 1998; 152(3):721-728.

(7) Airola K, Ahonen M, Johansson N, Heikkila P, Kere J, Kahari VM, Saarialho-Kere UK: Human TIMP-3 is expressed during fetal development, hair growth cycle, and cancer progression. J Histochem Cytochem 1998; 46(4):437-447.

(8) Al-Rawi MA, Mansel RE, Jiang WG: Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. Eur J Surg Oncol 2005; 31(2):117-121.

(9) Al-Rawi MA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG: Interleukin 7 upregulates vascular endothelial growth factor D in breast cancer cells and induces lymphangiogenesis in vivo. Br J Surg 2005; 92(3):305-310.

(10) Alakus H, Grass G, Hennecken JK, Bollschweiler E, Schulte C, Drebber U, Baldus SE, Metzger R, Holscher AH, Monig SP: Clinicopathological significance of MMP-2 and its specific inhibitor TIMP-2 in gastric cancer. Histol Histopathol 2008; 23(8):917-923.

(11) Alitalo K, Tammela T, Petrova TV: Lymphangiogenesis in development and human disease. Nature 2005; 438(7070):946-953.

(12) Allgayer H, Babic R, Beyer BC, Grutzner KU, Tarabichi A, Schildberg FW, Heiss MM: Prognostic relevance of MMP-2 (72-kD collagenase IV) in gastric cancer. Oncology 1998; 55(2):152-160.

(13) Alsaad KO, Serra S, Perren A, Hsieh E, Chetty R: CK19 and CD99 immunoexpression profile in goblet cell (mucin-producing neuroendocrine tumors) and classical carcinoids of the vermiform appendix. Int J Surg Pathol 2007; 15(3):252-257.

(14) Amioka T, Kitadai Y, Tanaka S, Haruma K, Yoshihara M, Yasui W, Chayama K: Vascular endothelial growth factor-C expression predicts lymph node metastasis of human gastric carcinomas invading the submucosa. Eur J Cancer 2002; 38(10):1413-1419.

(15) Anand-Apte B, Pepper MS, Voest E, Montesano R, Olsen B, Murphy G, Apte SS, Zetter B: Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. Invest Ophthalmol Vis Sci 1997; 38(5):817-823.

(16) Andarawewa KL, Boulay A, Masson R, Mathelin C, Stoll I, Tomasetto C, Chenard MP, Gintz M, Bellocq JP, Rio MC: Dual stromelysin-3 function during natural mouse mammary tumor virus-ras tumor progression. Cancer Res 2003; 63(18):5844-5849.

(17) Andre T, Kotelevets L, Vaillant JC, Coudray AM, Weber L, Prevot S, Parc R, Gespach C, Chastre E: Vegf, Vegf-B, Vegf-C and their receptors KDR, FLT-1 and FLT-4 during the neoplastic progression of human colonic mucosa. Int J Cancer 2000; 86(2):174-181.

(18) Aoki T, Nagakawa Y, Tsuchida A, Kasuya K, Kitamura K, Inoue K, Ozawa T, Koyanagi Y, Itoi T: Expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in pancreatic tumors. Oncol Rep 2002; 9(4):761-765.

(19) Arevalo JF, Garcia-Amaris RA: Intravitreal bevacizumab for diabetic retinopathy. Curr Diabetes Rev 2009; 5(1):39-46.

(20) Arora S, Kaur J, Sharma C, Mathur M, Bahadur S, Shukla NK, Deo SV, Ralhan R: Stromelysin 3, Ets-1, and vascular endothelial growth factor expression in oral precancerous and cancerous lesions: correlation with microvessel density, progression, and prognosis. Clin Cancer Res 2005; 11(6):2272-2284.

(21) Asano T, Tada M, Cheng S, Takemoto N, Kuramae T, Abe M, Takahashi O, Miyamoto M, Hamada J, Moriuchi T, Kondo S: Prognostic values of matrix metalloproteinase family expression in human colorectal carcinoma. J Surg Res 2008; 146(1):32-42.

(22) Aurello P, Rossi Del MS, D'Angelo F, Cicchini C, Ciardi A, Bellagamba R, Ravaioli M, Ramacciato G: Vascular endothelial growth factor C and microvessel density in gastric carcinoma: correlation with clinicopathological factors. Our experience and review of the literature. Oncol Res 2009; 17(9):405-411.

(23) Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De MM, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van HP, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Communi D, Shibuya M, Collen

D, Conway EM, Carmeliet P: Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. Nat Med 2003; 9(7):936-943.
(24) Bai YX, Yi JL, Li JF, Sui H: Clinicopathologic significance of BAG1 and TIMP3 expression in colon carcinoma. World J Gastroenterol 2007; 13(28):3883-3885.
(25) Baker AH, Edwards DR, Murphy G: Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. J Cell Sci 2002; 115(Pt 19):3719-3727.
(26) Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC: Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. J Clin Invest 1998; 101(6):1478-1487.
(27) Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ: Matrix metalloproteinases, their tissue inhibitors and colorectal cancer staging. Br J Surg 2000; 87(9):1215-1221.
(28) Baker EA, Bergin FG, Leaper DJ: Plasminogen activator system, vascular endothelial growth factor, and colorectal cancer progression. Mol Pathol 2000; 53(6):307-312.
(29) Baldini E, Toller M, Graziano FM, Russo FP, Pepe M, Biordi L, Marchioni E, Curcio F, Ulisse S, mbesi-Impiombato FS, D'Armiento M: Expression of matrix metalloproteinases and their specific inhibitors in normal and different human thyroid tumor cell lines. Thyroid 2004; 14(11):881-888.
(30) Balduyck M, Zerimech F, Gouyer V, Lemaire R, Hemon B, Grard G, Thiebaut C, Lemaire V, Dacquembronne E, Duhem T, Lebrun A, Dejonghe MJ, Huet G: Specific expression of matrix metalloproteinases 1, 3, 9 and 13 associated with invasiveness of breast cancer cells in vitro. Clin Exp Metastasis 2000; 18(2):171-178.
(31) Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D: Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. Blood 1996; 87(8):3336-3343.
(32) Barleon B, Totzke F, Herzog C, Blanke S, Kremmer E, Siemeister G, Marme D, Martiny-Baron G: Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. J Biol Chem 1997; 272(16):10382-10388.
(33) Basset P, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Rio MC, Chambon P: A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. Nature 1990; 348(6303):699-704.
(34) Bates RC, Mercurio AM: The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. Cancer Biol Ther 2005; 4(4):365-370.
(35) Beaulieu E, Kachra Z, Mousseau N, Delbecchi L, Hardy J, Beliveau R: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in human pituitary tumors. Neurosurgery 1999; 45(6):1432-1440.
(36) Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings MC, Hayward NK, Kay GF: Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. Circ Res 2000; 86(2):E29-E35.
(37) Bendardaf R, Lamlum H, Vihinen P, Ristamaki R, Laine J, Pyrhonen S: Low collagenase-1 (MMP-1) and MT1-MMP expression levels are favourable survival markers in advanced colorectal carcinoma. Oncology 2003; 65(4):337-346.
(38) Besig S, Voland P, Baur DM, Perren A, Prinz C: Vascular Endothelial Growth Factors, Angiogenesis, and Survival in Human Ileal Enterochromaffin Cell Carcinoids. Neuroendocrinology 2009; 90(4):402-415.
(39) Bhardwaj S, Roy H, Gruchala M, Viita H, Kholova I, Kokina I, Achen MG, Stacker SA, Hedman M, Alitalo K, Yla-Herttuala S: Angiogenic responses of vascular endothelial growth factors in periadventitial tissue. Hum Gene Ther 2003; 14(15):1451-1462.
(40) Bjorndahl MA, Cao R, Burton JB, Brakenhielm E, Religa P, Galter D, Wu L, Cao Y: Vascular endothelial growth factor-a promotes peritumoral lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. Cancer Res 2005; 65(20):9261-9268.
(41) Bloomston M, Shafii A, Zervos EE, Rojiani A, Rosemurgy AS: MMP-2 and TIMP-1 are derived from, not in response to, pancreatic cancer. J Surg Res 2002; 102(1):35-38.
(42) Bodey B, Bodey B, Jr., Siegel SE, Kaiser HE: Immunocytochemical detection of the expression of members of the matrix metalloproteinase family in adenocarcinomas of the pancreas. In Vivo 2001; 15(1):71-76.
(43) Bodey B, Bodey B, Jr., Siegel SE, Kaiser HE: Prognostic significance of matrix metalloproteinase expression in colorectal carcinomas. In Vivo 2000; 14(5):659-666.
(44) Boer K, Troost D, Spliet WG, van Rijen PC, Gorter JA, Aronica E: Cellular distribution of vascular endothelial growth factor A (VEGFA) and B (VEGFB) and VEGF receptors 1 and 2 in focal cortical dysplasia type IIB. Acta Neuropathol 2008; 115(6):683-696.
(45) Bolon I, Brambilla E, Vandenbunder B, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla C: Changes in the expression of matrix proteases and of the transcription factor c-Ets-1 during progression of precancerous bronchial lesions. Lab Invest 1996; 75(1):1-13.
(46) Bolon I, Devouassoux M, Robert C, Moro D, Brambilla C, Brambilla E: Expression of urokinase-type plasminogen activator, stromelysin 1, stromelysin 3, and matrilysin genes in lung carcinomas. Am J Pathol 1997; 150(5):1619-1629.
(47) Bono P, Wasenius VM, Heikkila P, Lundin J, Jackson DG, Joensuu H: High LYVE-1-positive lymphatic vessel numbers are associated with poor outcome in breast cancer. Clin Cancer Res 2004; 10(21):7144-7149.

(48) Boulay A, Masson R, Chenard MP, El FM, Cassard L, Bellocq JP, Sautes-Fridman C, Basset P, Rio MC: High cancer cell death in syngeneic tumors developed in host mice deficient for the stromelysin-3 matrix metalloproteinase. Cancer Res 2001; 61(5):2189-2193.
(49) Bracarda S, Caserta C, Sordini L, Rossi M, Hamzay A, Crino L: Protein kinase inhibitors in the treatment of renal cell carcinoma: sorafenib. Ann Oncol 2007; 18 Suppl 6:vi22-vi25.
(50) Bramhall SR, Neoptolemos JP, Stamp GW, Lemoine NR: Imbalance of expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of the matrix metalloproteinases (TIMPs) in human pancreatic carcinoma. J Pathol 1997; 182(3):347-355.
(51) Breier G, Clauss M, Risau W: Coordinate expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1) and its ligand suggests a paracrine regulation of murine vascular development. Dev Dyn 1995; 204(3):228-239.
(52) Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H: Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. Biochim Biophys Acta 2000; 1477(1-2):267-283.
(53) Brown DC, Gatter KC: Ki67 protein: the immaculate deception? Histopathology 2002; 40(1):2-11.
(54) Bruyere F, Melen-Lamalle L, Blacher S, Roland G, Thiry M, Moons L, Frankenne F, Carmeliet P, Alitalo K, Libert C, Sleeman JP, Foidart JM, Noel A: Modeling lymphangiogenesis in a three-dimensional culture system. Nat Methods 2008; 5(5):431-437.
(55) Buchler P, Reber HA, Buchler MW, Friess H, Hines OJ: VEGF-RII influences the prognosis of pancreatic cancer. Ann Surg 2002; 236(6):738-749.
(56) Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Buto S, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA, Bongarzone I: Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. Am J Pathol 1999; 155(6):1967-1976.
(57) Burke AP, Thomas RM, Elsayed AM, Sobin LH: Carcinoids of the jejunum and ileum: an immunohistochemical and clinicopathologic study of 167 cases. Cancer 1997; 79(6):1086-1093.
(58) Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH: Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). J Cell Mol Med 2005; 9(4):777-794.
(59) Calvani M, Trisciuoglio D, Bergamaschi C, Shoemaker RH, Melillo G: Differential involvement of vascular endothelial growth factor in the survival of hypoxic colon cancer cells. Cancer Res 2008; 68(1):285-291.
(60) Cao Y: Tumor angiogenesis and therapy. Biomed Pharmacother 2005; 59 Suppl 2:S340-S343.
(61) Cao Y, Linden P, Farnebo J, Cao R, Eriksson A, Kumar V, Qi JH, Claesson-Welsh L, Alitalo K: Vascular endothelial growth factor C induces angiogenesis in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(24):14389-14394.
(62) Capella C, Heitz PU, Hofler H, Solcia E, Kloppel G: Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut. Virchows Arch 1995; 425(6):547-560.
(63) Caplin ME, Buscombe JR, Hilson AJ, Jones AL, Watkinson AF, Burroughs AK: Carcinoid tumour. Lancet 1998; 352(9130):799-805.
(64) Carmeliet P: VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. Oncology 2005; 69 Suppl 3:4-10.
(65) Carmeliet P: Angiogenesis in health and disease. Nat Med 2003; 9(6):653-660.
(66) Carmeliet P: Angiogenesis in life, disease and medicine. Nature 2005; 438(7070):932-936.
(67) Carmeliet P, Jain RK: Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature 2000; 407(6801):249-257.
(68) Carrillo de Santa PE, Arias FC, Caso PE, Munoz Molina GM, Sanchez H, I, Muguruza T, I, Moreno BR, Sacristan LS, Gomez PA, del Val Toledo LM: Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their receptors R1, R2, and R3 in patients with nonsmall cell lung cancer. Cancer 2009; 115(8):1701-1712.
(69) Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D: Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. Cancer Cell 2005; 8(4):299-309.
(70) Cavalheiro BG, Junqueira CR, Brandao LG: Expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2) in medullary thyroid carcinoma: prognostic implications. Thyroid 2008; 18(8):865-871.
(71) Chan CC, Menges M, Orzechowski HD, Orendain N, Pistorius G, Feifel G, Zeitz M, Stallmach A: Increased matrix metalloproteinase 2 concentration and transcript expression in advanced colorectal carcinomas. Int J Colorectal Dis 2001; 16(3):133-140.
(72) Chau I, Rigg A, Cunningham D: Matrix metalloproteinase inhibitors--an emphasis on gastrointestinal malignancies. Crit Rev Oncol Hematol 2003; 45(2):151-176.
(73) Chetty C, Lakka SS, Bhoopathi P, Kunigal S, Geiss R, Rao JS: Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 suppresses tumor angiogenesis in matrix metalloproteinase 2-down-regulated lung cancer. Cancer Res 2008; 68(12):4736-4745.
(74) Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR: Novel functions of TIMPs in cell signaling. Cancer Metastasis Rev 2006; 25(1):99-113.
(75) Cho MK, Eimoto T, Tateyama H, Arai Y, Fujiyoshi Y, Hamaguchi M: Expression of matrix metalloproteinases in benign and malignant follicular thyroid lesions. Histopathology 2006; 48(3):286-294.
(76) Cho YB, Lee WY, Song SY, Shin HJ, Yun SH, Chun HK: Matrix metalloproteinase-9 activity is associated with poor prognosis in T3-T4 node-negative colorectal cancer. Hum Pathol 2007; 38(11):1603-1610.
(77) Choi JH, Oh YH, Park YW, Baik HK, Lee YY, Kim IS: Correlation of vascular endothelial growth factor-D expression and VEGFR-3-positive vessel density with lymph node metastasis in gastric carcinoma. J Korean Med Sci 2008; 23(4):592-597.

(78) Christensen JG: A preclinical review of sunitinib, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor with anti-angiogenic and antitumour activities. Ann Oncol 2007; 18 Suppl 10:x3-10.
(79) Christofori G, Naik P, Hanahan D: Vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and flk-1, are expressed in normal pancreatic islets and throughout islet cell tumorigenesis. Mol Endocrinol 1995; 9(12):1760-1770.
(80) Chung GG, Yoon HH, Zerkowski MP, Ghosh S, Thomas L, Harigopal M, Charette LA, Salem RR, Camp RL, Rimm DL, Burtness BA: Vascular endothelial growth factor, FLT-1, and FLK-1 analysis in a pancreatic cancer tissue microarray. Cancer 2006; 106(8):1677-1684.
(81) Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J, Risau W: The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. J Biol Chem 1996; 271(30):17629-17634.
(82) Collins HM, Morris TM, Watson SA: Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitors of metalloproteinases and membrane type-1-matrix metalloproteinase. Br J Cancer 2001; 84(12):1664-1670.
(83) Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z: MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. Cell 2000; 103(3):481-490.
(84) Couvelard A, O'Toole D, Turley H, Leek R, Sauvanet A, Degott C, Ruszniewski P, Belghiti J, Harris AL, Gatter K, Pezzella F: Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumour progression. Br J Cancer 2005; 92(1):94-101.
(85) Cruz-Munoz W, Kim I, Khokha R: TIMP-3 deficiency in the host, but not in the tumor, enhances tumor growth and angiogenesis. Oncogene 2006; 25(4):650-655.
(86) Cunningham JL, Grimelius L, Sundin A, Agarwal S, Janson ET: Malignant ileocaecal serotonin-producing carcinoid tumours: the presence of a solid growth pattern and/or Ki67 index above 1% identifies patients with a poorer prognosis. Acta Oncol 2007; 46(6):747-756.
(87) Curran S, Dundas SR, Buxton J, Leeman MF, Ramsay R, Murray GI: Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. Clin Cancer Res 2004; 10(24):8229-8234.
(88) Cursiefen C, Chen L, Saint-Geniez M, Hamrah P, Jin Y, Rashid S, Pytowski B, Persaud K, Wu Y, Streilein JW, Dana R: Nonvascular VEGF receptor 3 expression by corneal epithelium maintains avascularity and vision. Proc Natl Acad Sci U S A 2006; 103(30):11405-11410.
(89) Darnton SJ, Hardie LJ, Muc RS, Wild CP, Casson AG: Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) gene is methylated in the development of esophageal adenocarcinoma: loss of expression correlates with poor prognosis. Int J Cancer 2005; 115(3):351-358.
(90) Das S, Skobe M: Lymphatic vessel activation in cancer. Ann N Y Acad Sci 2008; 1131:235-241.
(91) Dass CR, Tran TM, Choong PF: Angiogenesis inhibitors and the need for anti-angiogenic therapeutics. J Dent Res 2007; 86(10):927-936.
(92) de Herder WW, Oberg K: Clinical and biochemical markers; in: Modlin IM, Oberg K, (eds): A Century of advances in neuroendocrine tumor biology and treatment. Felsenstein C.C.C.P., 2007, pp 304-307.
(93) de la Torre NG, Buley I, Wass JA, Turner HE: Angiogenesis and lymphangiogenesis in thyroid proliferative lesions: relationship to type and tumour behaviour. Endocr Relat Cancer 2006; 13(3):931-944.
(94) de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. Science 1992; 255(5047):989-991.
(95) del Casar Lizcano JM, Vizoso PF, Gonzalez Sanchez LO, Martin SA, Gava R, Cuesta FE, ez Santisteban MC: [Expression and clinical significance of collagenase-3 (MMP-13) in gastric cancer]. Gastroenterol Hepatol 2003; 26(1):1-7.
(96) Deng H, Guo RF, Li WM, Zhao M, Lu YY: Matrix metalloproteinase 11 depletion inhibits cell proliferation in gastric cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 2005; 326(2):274-281.
(97) Des Guetz G, Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Morere JF, Benamouzig R, Breau JL, Perret GY: Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. Br J Cancer 2006; 94(12):1823-1832.
(98) Dias S, Hattori K, Zhu Z, Heissig B, Choy M, Lane W, Wu Y, Chadburn A, Hyjek E, Gill M, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S: Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. J Clin Invest 2000; 106(4):511-521.
(99) DiSario JA, Burt RW, Vargas H, McWhorter WP: Small bowel cancer: epidemiological and clinical characteristics from a population-based registry. Am J Gastroenterol 1994; 89(5):699-701.
(100) Dudderidge TJ, McCracken SR, Loddo M, Fanshawe TR, Kelly JD, Neal DE, Leung HY, Williams GH, Stoeber K: Mitogenic growth signalling, DNA replication licensing, and survival are linked in prostate cancer. Br J Cancer 2007; 96(9):1384-1393.
(101) Duff SE, Jeziorska M, Kumar S, Haboubi N, Sherlock D, O'Dwyer ST, Jayson GC: Lymphatic vessel density, microvessel density and lymphangiogenic growth factor expression in colorectal cancer. Colorectal Dis 2007; 9(9):793-800.
(102) Duff SE, Jeziorska M, Rosa DD, Kumar S, Haboubi N, Sherlock D, O'Dwyer ST, Jayson GC: Vascular endothelial growth factors and receptors in colorectal cancer: implications for anti-angiogenic therapy. Eur J Cancer 2006; 42(1):112-117.
(103) Duff SE, Li C, Jeziorska M, Kumar S, Saunders MP, Sherlock D, O'Dwyer ST, Jayson GC: Vascular endothelial growth factors C and D and lymphangiogenesis in gastrointestinal tract malignancy. Br J Cancer 2003; 89(3):426-430.

(104) Duran I, Salazar R, Casanovas O, Arrazubi V, Vilar E, Siu LL, Yao J, Tabernero J: New drug development in digestive neuroendocrine tumors. Ann Oncol 2007; 18(8):1307-1313.
(105) Egeblad M, Werb Z: New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat Rev Cancer 2002; 2(3):161-174.
(106) Eiden LE, Schafer MK, Weihe E, Schutz B: The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. Pflugers Arch 2004; 447(5):636-640.
(107) Eissele R, Anlauf M, Schafer MK, Eiden LE, Arnold R, Weihe E: Expression of vesicular monoamine transporters in endocrine hyperplasia and endocrine tumors of the oxyntic stomach. Digestion 1999; 60(5):428-439.
(108) Elnemr A, Yonemura Y, Bandou E, Kinoshita K, Kawamura T, Takahashi S, Tochiori S, Endou Y, Sasaki T: Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in human gastric cancer. Gastric Cancer 2003; 6(1):30-38.
(109) Enholm B, Paavonen K, Ristimaki A, Kumar V, Gunji Y, Klefstrom J, Kivinen L, Laiho M, Olofsson B, Joukov V, Eriksson U, Alitalo K: Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. Oncogene 1997; 14(20):2475-2483.
(110) Erickson JD, Schafer MK, Bonner TI, Eiden LE, Weihe E: Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine transporter. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(10):5166-5171.
(111) Erickson JD, Varoqui H: Molecular analysis of vesicular amine transporter function and targeting to secretory organelles. FASEB J 2000; 14(15):2450-2458.
(112) Eriksson B, Kloppel G, Krenning E, Ahlman H, Plockinger U, Wiedenmann B, Arnold R, Auernhammer C, Korner M, Rindi G, Wildi S: Consensus guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine tumors--well-differentiated jejunal-ileal tumor/carcinoma. Neuroendocrinology 2008; 87(1):8-19.
(113) Etoh T, Inoue H, Yoshikawa Y, Barnard GF, Kitano S, Mori M: Increased expression of collagenase-3 (MMP-13) and MT1-MMP in oesophageal cancer is related to cancer aggressiveness. Gut 2000; 47(1):50-56.
(114) Faivre S, Delbaldo C, Vera K, Robert C, Lozahic S, Lassau N, Bello C, Deprimo S, Brega N, Massimini G, Armand JP, Scigalla P, Raymond E: Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. J Clin Oncol 2006; 24(1):25-35.
(115) Falconi M, Plockinger U, Kwekkeboom DJ, Manfredi R, Korner M, Kvols L, Pape UF, Ricke J, Goretzki PE, Wildi S, Steinmuller T, Oberg K, Scoazec JY: Well-differentiated pancreatic nonfunctioning tumors/carcinoma. Neuroendocrinology 2006; 84(3):196-211.
(116) Fan F, Wey JS, McCarty MF, Belcheva A, Liu W, Bauer TW, Somcio RJ, Wu Y, Hooper A, Hicklin DJ, Ellis LM: Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. Oncogene 2005; 24(16):2647-2653.
(117) Fan SQ, Wei QY, Li MR, Zhang LQ, Liang QC: [Expression and clinical significance of MMP-2, MMP-9,TIMP-1, and TIMP-2 in breast carcinoma]. Ai Zheng 2003; 22(9):968-973.
(118) Favier J, Plouin PF, Corvol P, Gasc JM: Angiogenesis and vascular architecture in pheochromocytomas: distinctive traits in malignant tumors. Am J Pathol 2002; 161(4):1235-1246.
(119) Fendrich V, Slater EP, Heinmoller E, Ramaswamy A, Celik I, Nowak O, Chaloupka B, Gerdes B, Bartsch DK: Alterations of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) gene in pancreatic adenocarcinomas. Pancreas 2005; 30(2):e40-e45.
(120) Fenton C, Patel A, Dinauer C, Robie DK, Tuttle RM, Francis GL: The expression of vascular endothelial growth factor and the type 1 vascular endothelial growth factor receptor correlate with the size of papillary thyroid carcinoma in children and young adults. Thyroid 2000; 10(4):349-357.
(121) Fernandez-Figueras MT, Puig L, Musulen E, Gilaberte M, Lerma E, Serrano S, Ferrandiz C, Ariza A: Expression profiles associated with aggressive behavior in Merkel cell carcinoma. Mod Pathol 2007; 20(1):90-101.
(122) Ferrara N: Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev 2004; 25(4):581-611.
(123) Ferrara N: VEGF as a therapeutic target in cancer. Oncology 2005; 69 Suppl 3:11-16.
(124) Ferrara N: Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. Am J Physiol Cell Physiol 2001; 280(6):C1358-C1366.
(125) Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J: The biology of VEGF and its receptors. Nat Med 2003; 9(6):669-676.
(126) Ferrara N, Kerbel RS: Angiogenesis as a therapeutic target. Nature 2005; 438(7070):967-974.
(127) Fingleton B: MMPs as therapeutic targets--still a viable option? Semin Cell Dev Biol 2008; 19(1):61-68.
(128) Folkman J: Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin Oncol 2002; 29(6 Suppl 16):15-18.
(129) Fong GH, Klingensmith J, Wood CR, Rossant J, Breitman ML: Regulation of flt-1 expression during mouse embryogenesis suggests a role in the establishment of vascular endothelium. Dev Dyn 1996; 207(1):1-10.
(130) Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML: Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. Nature 1995; 376(6535):66-70.
(131) Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J: Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. Development 1999; 126(13):3015-3025.
(132) Forrer F, Valkema R, Kwekkeboom DJ, de JM, Krenning EP: Neuroendocrine tumors. Peptide receptor radionuclide therapy. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2007; 21(1):111-129.

(133) Freije JM, ez-Itza I, Balbin M, Sanchez LM, Blasco R, Tolivia J, Lopez-Otin C: Molecular cloning and expression of collagenase-3, a novel human matrix metalloproteinase produced by breast carcinomas. J Biol Chem 1994; 269(24):16766-16773.
(134) Frisch SM, Francis H: Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. J Cell Biol 1994; 124(4):619-626.
(135) Fu X, Parks WC, Heinecke JW: Activation and silencing of matrix metalloproteinases. Semin Cell Dev Biol 2008; 19(1):2-13.
(136) Funaki H, Nishimura G, Harada S, Ninomiya I, Terada I, Fushida S, Tani T, Fujimura T, Kayahara M, Shimizu K, Ohta T, Miwa K: Expression of vascular endothelial growth factor D is associated with lymph node metastasis in human colorectal carcinoma. Oncology 2003; 64(4):416-422.
(137) Gallegos NC, Smales C, Savage FJ, Hembry RM, Boulos PB: The distribution of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in colorectal cancer. Surg Oncol 1995; 4(2):111-119.
(138) Gao J, Knutsen A, Arbman G, Carstensen J, Franlund B, Sun XF: Clinical and biological significance of angiogenesis and lymphangiogenesis in colorectal cancer. Dig Liver Dis 2009; 41(2):116-122.
(139) Gao P, Zhou GY, Zhang QH, Su ZX, Zhang TG, Xiang L, Wang Y, Zhang SL, Mu K: Lymphangiogenesis in gastric carcinoma correlates with prognosis. J Pathol 2009; 218(2):192-200.
(140) Gao P, Zhou GY, Zhang QH, Xiang L, Zhang SL, Li C, Sun YL: Clinicopathological significance of peritumoral lymphatic vessel density in gastric carcinoma. Cancer Lett 2008; 263(2):223-230.
(141) Garbett EA, Reed MW, Brown NJ: Proteolysis in colorectal cancer. Mol Pathol 1999; 52(3):140-145.
(142) Garcia de la Torre N, Buley I, Wass JA, Jackson DG, Turner HE: Angiogenesis and lymphangiogenesis in parathyroid proliferative lesions. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89(6):2890-2896.
(143) Gebert G, Thomas C: Tumoren des diffusen neuroendokrinen Systems; in: Thomas C, (ed): Spezielle Pathologie.Pathologie. Stuttgart, Schattauer, 1996, pp 321-325.
(144) George ML, Tutton MG, Janssen F, Arnaout A, Abulafi AM, Eccles SA, Swift RI: VEGF-A, VEGF-C, and VEGF-D in colorectal cancer progression. Neoplasia 2001; 3(5):420-427.
(145) Gershtein ES, Korotkova EA, Prorokov VV, Kushlinsky NE: Matrix metalloproteinases 2, 3, 13 and their type 2 tissue inhibitor in tumors and plasma of patients with colorectal cancer. Bull Exp Biol Med 2008; 145(3):362-366.
(146) Giannopoulos G, Pavlakis K, Parasi A, Kavatzas N, Tiniakos D, Karakosta A, Tzanakis N, Peros G: The expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their tissue inhibitor 2 in pancreatic ductal and ampullary carcinoma and their relation to angiogenesis and clinicopathological parameters. Anticancer Res 2008; 28(3B):1875-1881.
(147) Goldberg GI, Strongin A, Collier IE, Genrich LT, Marmer BL: Interaction of 92-kDa type IV collagenase with the tissue inhibitor of metalloproteinases prevents dimerization, complex formation with interstitial collagenase, and activation of the proenzyme with stromelysin. J Biol Chem 1992; 267(7):4583-4591.
(148) Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP: Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur J Cell Biol 1997; 74(2):111-122.
(149) Gong J, Zhao Y, bdel-Fattah R, Amos S, Xiao A, Lopes MB, Hussaini IM, Laws ER: Matrix metalloproteinase-9, a potential biological marker in invasive pituitary adenomas. Pituitary 2008; 11(1):37-48.
(150) Gong YL, Xu GM, Huang WD, Chen LB: Expression of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of metalloproteinases and their local invasiveness and metastasis in Chinese human pancreatic cancer. J Surg Oncol 2000; 73(2):95-99.
(151) Gu P, Xing X, Tanzer M, Rocken C, Weichert W, Ivanauskas A, Pross M, Peitz U, Malfertheiner P, Schmid RM, Ebert MP: Frequent loss of TIMP-3 expression in progression of esophageal and gastric adenocarcinomas. Neoplasia 2008; 10(6):563-572.
(152) Gu ZD, Li JY, Li M, Gu J, Shi XT, Ke Y, Chen KN: Matrix metalloproteinases expression correlates with survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Am J Gastroenterol 2005; 100(8):1835-1843.
(153) Gubala E, Wiench M, Oczko-Wojciechowska M, Lange D, Wloch J, Czarniecka A, Chmielik E, Nikiel B, Wygoda Z, Kukulska A, Handkiewicz-Junak D, Szpak-Ulczok S, Krawczyk A, Roskosz J, Jarzab B: [Gene expression analysis by DNA microarray in papillary thyroid cancer]. Endokrynol Pol 2005; 56(5):752-757.
(154) Gunningham SP, Currie MJ, Han C, Robinson BA, Scott PA, Harris AL, Fox SB: VEGF-B expression in human primary breast cancers is associated with lymph node metastasis but not angiogenesis. J Pathol 2001; 193(3):325-332.
(155) Gunningham SP, Currie MJ, Han C, Turner K, Scott PA, Robinson BA, Harris AL, Fox SB: Vascular endothelial growth factor-B and vascular endothelial growth factor-C expression in renal cell carcinomas: regulation by the von Hippel-Lindau gene and hypoxia. Cancer Res 2001; 61(7):3206-3211.
(156) Gurevich LE: Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in determination of invasive potential of pancreatic tumors. Bull Exp Biol Med 2003; 136(5):494-498.
(157) Gustafsson BI, Kidd M, Drozdov I, Modlin IM: The Enterochromaffin Cell; in: Modlin IM, Oberg K, (eds): A Century of advances in neuroendocrine tumor biology and treatment. Felsenstein C.C.C.P., 2007, pp 178-191.
(158) Gustafsson BI, Kidd M, Modlin IM: Small intestinal neuroendocrine Tumors; in: Modlin IM, Oberg K, (eds): A Century of advances in neuroendocrine tumor biology and treatment. Felsenstein C.C.C.P., 2007, pp 100-111.

(159) Hachisuka T, Narikiyo M, Yamada Y, Ishikawa H, Ueno M, Uchida H, Yoriki R, Ohigashi Y, Miki K, Tamaki H, Mizuno T, Nakajima Y: High lymphatic vessel density correlates with overexpression of VEGF-C in gastric cancer. Oncol Rep 2005; 13(4):733-737.
(160) Haiko P, Makinen T, Keskitalo S, Taipale J, Karkkainen MJ, Baldwin ME, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K: Deletion of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF-D is not equivalent to VEGF receptor 3 deletion in mouse embryos. Mol Cell Biol 2008; 28(15):4843-4850.
(161) Hall FT, Freeman JL, Asa SL, Jackson DG, Beasley NJ: Intratumoral lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2003; 129(7):716-719.
(162) Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell 1996; 86(3):353-364.
(163) Hanrahan V, Currie MJ, Gunningham SP, Morrin HR, Scott PA, Robinson BA, Fox SB: The angiogenic switch for vascular endothelial growth factor (VEGF)-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D in the adenoma-carcinoma sequence during colorectal cancer progression. J Pathol 2003; 200(2):183-194.
(164) Hansel DE, Rahman A, Hermans J, de Krijger RR, Ashfaq R, Yeo CJ, Cameron JL, Maitra A: Liver metastases arising from well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms demonstrate increased VEGF-C expression. Mod Pathol 2003; 16(7):652-659.
(165) Harada Y, Ogata Y, Shirouzu K: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR (kinase domain-containing receptor)/Flk-1 (fetal liver kinase-1) as prognostic factors in human colorectal cancer. Int J Clin Oncol 2001; 6(5):221-228.
(166) Harms V: Biomathematik, Statistik und Dokumentation: Eine leicht verständliche Einführung. ed 7., Kiel-Mönkeberg, Germany, Harms Verlag, 1998.
(167) 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. Int J Cancer 2008; 123(4):867-873.
(168) Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendrikx J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S: Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. Nat Med 2002; 8(8):841-849.
(169) He DS, Chen MZ, Wang HJ, Ke CL, Yan C, Zheng H, Hong YS: [Role of matrix metalloproteinases-9, 2 and their inhibitor-TIMP-1, 2 in invasive pituitary adenomas biological behavior]. Ai Zheng 2002; 21(10):1124-1128.
(170) Hemminki K, Li X: Familial carcinoid tumors and subsequent cancers: a nation-wide epidemiologic study from Sweden. Int J Cancer 2001; 94(3):444-448.
(171) Hemminki K, Li X: Incidence trends and risk factors of carcinoid tumors: a nationwide epidemiologic study from Sweden. Cancer 2001; 92(8):2204-2210.
(172) Herold G, Heintges T: NET des ILeums und der Appendix; in: Herold G, (ed): Innere Medizin eine vorlesungsorientierte Darstellung. Köln, Germany, Herold, 2007, pp 459-460.
(173) Herszenyi L, Sipos F, Galamb O, Solymosi N, Hritz I, Miheller P, Berczi L, Molnar B, Tulassay Z: Matrix metalloproteinase-9 expression in the normal mucosa-adenoma-dysplasia-adenocarcinoma sequence of the colon. Pathol Oncol Res 2008; 14(1):31-37.
(174) Hiller O, Lichte A, Oberpichler A, Kocourek A, Tschesche H: Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII. J Biol Chem 2000; 275(42):33008-33013.
(175) Hilska M, Roberts PJ, Collan YU, Laine VJ, Kossi J, Hirsimaki P, Rahkonen O, Laato M: Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1, -2, -7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 and -4 in colorectal cancer. Int J Cancer 2007; 121(4):714-723.
(176) Hirakawa S, Kodama S, Kunstfeld R, Kajiya K, Brown LF, Detmar M: VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. J Exp Med 2005; 201(7):1089-1099.
(177) Hirashima Y, Yamada Y, Matsubara J, Takahari D, Okita N, Takashima A, Kato K, Hamaguchi T, Shirao K, Shimada Y, Taniguchi H, Shimoda T: Impact of vascular endothelial growth factor receptor 1, 2, and 3 expression on the outcome of patients with gastric cancer. Cancer Sci 2008.
(178) Hiratsuka S, Maru Y, Okada A, Seiki M, Noda T, Shibuya M: Involvement of Flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor-1) in pathological angiogenesis. Cancer Res 2001; 61(3):1207-1213.
(179) Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, Shibuya M: Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(16):9349-9354.
(180) Hiratsuka S, Nakamura K, Iwai S, Murakami M, Itoh T, Kijima H, Shipley JM, Senior RM, Shibuya M: MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. Cancer Cell 2002; 2(4):289-300.
(181) Hiripi E, Bermejo JL, Sundquist J, Hemminki K: Familial gastrointestinal carcinoid tumours and associated cancers. Ann Oncol 2009; 20(5):950-954.
(182) Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA: Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. Pharmacol Rev 2004; 56(4):549-580.
(183) Hoekstra R, Eskens FA, Verweij J: Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. Oncologist 2001; 6(5):415-427.
(184) Hoikkala S, Paakko P, Soini Y, Makitaro R, Kinnula V, Turpeenniemi-Hujanen T: Tissue MMP-2 and MMP-9 [corrected] are better prognostic factors than serum MMP-2/TIMP-2--complex or TIMP-1 [corrected] in stage [corrected] I-III lung carcinoma. Cancer Lett 2006; 236(1):125-132.

(185) Hojilla CV, Mohammed FF, Khokha R: Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors direct cell fate during cancer development. Br J Cancer 2003; 89(10):1817-1821.
(186) Hong YK, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Hirakawa S, Kunstfeld R, Brown LF, Bohlen P, Senger DR, Detmar M: VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. FASEB J 2004; 18(10):1111-1113.
(187) Hu WG, Li JW, Feng B, Beveridge M, Yue F, Lu AG, Ma JJ, Wang ML, Guo Y, Jin XL, Zheng MH: Vascular endothelial growth factors C and D represent novel prognostic markers in colorectal carcinoma using quantitative image analysis. Eur Surg Res 2007; 39(4):229-238.
(188) Huang SM, Lee JC, Wu TJ, Chow NH: Clinical relevance of vascular endothelial growth factor for thyroid neoplasms. World J Surg 2001; 25(3):302-306.
(189) Hucz J, Kowalska M, Jarzab M, Wiench M: [Gene expression of metalloproteinase 11, claudin 1 and selected adhesion related genes in papillary thyroid cancer.]. Endokrynol Pol 2006; 57(Suppl A):18-25.
(190) Hussain N, Ghanekar Y, Kaur I: The future implications and indications of anti-vascular endothelial growth factor therapy in ophthalmic practice. Indian J Ophthalmol 2007; 55(6):445-450.
(191) Ichikura T, Tomimatsu S, Ohkura E, Mochizuki H: Prognostic significance of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-C in gastric carcinoma. J Surg Oncol 2001; 78(2):132-137.
(192) Ikeda N, Adachi M, Taki T, Huang C, Hashida H, Takabayashi A, Sho M, Nakajima Y, Kanehiro H, Hisanaga M, Nakano H, Miyake M: Prognostic significance of angiogenesis in human pancreatic cancer. Br J Cancer 1999; 79(9-10):1553-1563.
(193) Ikeguchi M, Oka S, Saito H, Kondo A, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N: The expression of vascular endothelial growth factor and proliferative activity of cancer cells in gastric cancer. Langenbecks Arch Surg 1999; 384(3):264-270.
(194) Inoue A, Moriya H, Katada N, Tanabe S, Kobayashi N, Watanabe M, Okayasu I, Ohbu M: Intratumoral lymphangiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma and relationship with regulatory factors and prognosis. Pathol Int 2008; 58(10):611-619.
(195) Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, Wijelath ES: Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. J Cell Physiol 2001; 188(3):359-368.
(196) Itakura J, Ishiwata T, Friess H, Fujii H, Matsumoto Y, Buchler MW, Korc M: Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression. Clin Cancer Res 1997; 3(8):1309-1316.
(197) Ito N, Huang K, Claesson-Welsh L: Signal transduction by VEGF receptor-1 wild type and mutant proteins. Cell Signal 2001; 13(11):849-854.
(198) Ito Y, Yoshida H, Kakudo K, Nakamura Y, Kuma K, Miyauchi A: Inverse relationships between the expression of MMP-7 and MMP-11 and predictors of poor prognosis of papillary thyroid carcinoma. Pathology 2006; 38(5):421-425.
(199) Iwata T, Miyata Y, Kanda S, Nishikido M, Hayashi T, Sakai H, Kanetake H: Lymphangiogenesis and angiogenesis in conventional renal cell carcinoma: association with vascular endothelial growth factors A to D immunohistochemistry. Urology 2008; 71(4):749-754.
(200) Jackson DG: Biology of the lymphatic marker LYVE-1 and applications in research into lymphatic trafficking and lymphangiogenesis. APMIS 2004; 112(7-8):526-538.
(201) Jakobsen AM, Andersson P, Saglik G, Andersson E, Kolby L, Erickson JD, Forssell-Aronsson E, Wangberg B, Ahlman H, Nilsson O: Differential expression of vesicular monoamine transporter (VMAT) 1 and 2 in gastrointestinal endocrine tumours. J Pathol 2001; 195(4):463-472.
(202) Jebreel A, England J, Bedford K, Murphy J, Karsai L, Atkin S: Vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF receptors expression and microvascular density in benign and malignant thyroid diseases. Int J Exp Pathol 2007; 88(4):271-277.
(203) Jensen RT, Rindi G, Arnold R, Lopes JM, Brandi ML, Bechstein WO, Christ E, Taal BG, Knigge U, Ahlman H, Kwekkeboom DJ, O'Toole D: Well-differentiated duodenal tumor/carcinoma (excluding gastrinomas). Neuroendocrinology 2006; 84(3):165-172.
(204) Ji RC: Lymphatic endothelial cells, lymphangiogenesis, and extracellular matrix. Lymphat Res Biol 2006; 4(2):83-100.
(205) Ji RC: Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. Cancer Metastasis Rev 2006; 25(4):677-694.
(206) Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE: Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. Oncogene 2002; 21(14):2245-2252.
(207) Jin KL, Mao XO, Greenberg DA: Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97(18):10242-10247.
(208) John A, Tuszynski G: The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. Pathol Oncol Res 2001; 7(1):14-23.
(209) Johnson LD, Hunt DM, Kim K, Nachtigal M: Amplification of stromelysin-3 transcripts from carcinomas of the colon. Hum Pathol 1996; 27(9):964-968.
(210) Jones LE, Humphreys MJ, Campbell F, Neoptolemos JP, Boyd MT: Comprehensive analysis of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor expression in pancreatic cancer: increased expression of matrix metalloproteinase-7 predicts poor survival. Clin Cancer Res 2004; 10(8):2832-2845.
(211) Joo YE, Seo KS, Kim HS, Rew JS, Park CS, Kim SJ: Expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in gastric cancer. Dig Dis Sci 2000; 45(1):114-121.
(212) Joo YE, Seo KS, Kim J, Kim HS, Rew JS, Park CS, Kim SJ: Role of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in colorectal carcinoma. J Korean Med Sci 1999; 14(4):417-423.

(213) Joo YE, Sohn YH, Joo SY, Lee WS, Min SW, Park CH, Rew JS, Choi SK, Park CS, Kim YJ, Kim SJ: The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and p53 status for angiogenesis in gastric cancer. Korean J Intern Med 2002; 17(4):211-219.
(214) Joo YE, Sohn YH, Lee WS, Park CH, Choi SK, Rew JS, Park CS, Kim SJ: Expression of vascular endothelial growth factor and p53 in pancreatic carcinomas. Korean J Intern Med 2002; 17(3):153-159.
(215) Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K: A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. EMBO J 1996; 15(2):290-298.
(216) Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K: Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C. EMBO J 1997; 16(13):3898-3911.
(217) Jumper C, Cobos E, Lox C: Determination of the serum matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in patients with either advanced small-cell lung cancer or non-small-cell lung cancer prior to treatment. Respir Med 2004; 98(2):173-177.
(218) Jung KK, Liu XW, Chirco R, Fridman R, Kim HR: Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. EMBO J 2006; 25(17):3934-3942.
(219) Jung SA, Yang SK, Kim JS, Shim KN, Im SA, Myung SJ, Jung HY, Yu CS, Kim JC, Hong WS, Kim JH, Min YI: [The expression of matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) and angiogenesis in relation to the depth of tumor invasion and lymph node metastasis in submucosally invasive colorectal carcinoma]. Korean J Gastroenterol 2005; 45(6):401-408.
(220) Juttner S, Wissmann C, Jons T, Vieth M, Hertel J, Gretschel S, Schlag PM, Kemmner W, Hocker M: Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. J Clin Oncol 2006; 24(2):228-240.
(221) Juuti A, Lundin J, Nordling S, Louhimo J, Haglund C: Epithelial MMP-2 expression correlates with worse prognosis in pancreatic cancer. Oncology 2006; 71(1-2):61-68.
(222) Kadambi A, Mouta CC, Yun CO, Padera TP, Dolmans DE, Carmeliet P, Fukumura D, Jain RK: Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C differentially affects tumor vascular function and leukocyte recruitment: role of VEGF-receptor 2 and host VEGF-A. Cancer Res 2001; 61(6):2404-2408.
(223) Kalinowski M, Dressler M, Konig A, El-Sheik M, Rinke A, Hoffken H, Gress TM, Arnold R, Klose KJ, Wagner HJ: Selective internal radiotherapy with Yttrium-90 microspheres for hepatic metastatic neuroendocrine tumors: a prospective single center study. Digestion 2009; 79(3):137-142.
(224) Kaltsas GA, Besser GM, Grossman AB: The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors. Endocr Rev 2004; 25(3):458-511.
(225) Kamba T, McDonald DM: Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. Br J Cancer 2007; 96(12):1788-1795.
(226) Kanda M, Nomoto S, Nishikawa Y, Sugimoto H, Kanazumi N, Takeda S, Nakao A: Correlations of the expression of vascular endothelial growth factor B and its isoforms in hepatocellular carcinoma with clinico-pathological parameters. J Surg Oncol 2008; 98(3):190-196.
(227) Kaneko T, Konno H, Baba M, Tanaka T, Nakamura S: Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer. Cancer Sci 2003; 94(1):43-49.
(228) Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG: CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. Cancer Res 2001; 61(7):2847-2851.
(229) Kang SH, Choi HH, Kim SG, Jong HS, Kim NK, Kim SJ, Bang YJ: Transcriptional inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene by dna hypermethylation of the 5'-CpG island in human gastric cancer cell lines. Int J Cancer 2000; 86(5):632-635.
(230) Karameris A, Panagou P, Tsilalis T, Bouros D: Association of expression of metalloproteinases and their inhibitors with the metastatic potential of squamous-cell lung carcinomas. A molecular and immunohistochemical study. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156(6):1930-1936.
(231) Karamysheva AF: Mechanisms of angiogenesis. Biochemistry (Mosc) 2008; 73(7):751-762.
(232) Karpanen T, Heckman CA, Keskitalo S, Jeltsch M, Ollila H, Neufeld G, Tamagnone L, Alitalo K: Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. FASEB J 2006; 20(9):1462-1472.
(233) Kato H, Yoshikawa M, Miyazaki T, Nakajima M, Fukai Y, Masuda N, Fukuchi M, Manda R, Tsukada K, Kuwano H: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) in esophageal squamous cell carcinoma. Anticancer Res 2002; 22(6C):3977-3984.
(234) Kawakami M, Furuhata T, Kimura Y, Yamaguchi K, Hata F, Sasaki K, Hirata K: Expression analysis of vascular endothelial growth factors and their relationships to lymph node metastasis in human colorectal cancer. J Exp Clin Cancer Res 2003; 22(2):229-237.
(235) Kawano N, Osawa H, Ito T, Nagashima Y, Hirahara F, Inayama Y, Nakatani Y, Kimura S, Kitajima H, Koshikawa N, Miyazaki K, Kitamura H: Expression of gelatinase A, tissue inhibitor of metalloproteinases-2, matrilysin, and trypsin(ogen) in lung neoplasms: an immunohistochemical study. Hum Pathol 1997; 28(5):613-622.
(236) Kennedy AS, Dezarn WA, McNeillie P, Coldwell D, Nutting C, Carter D, Murthy R, Rose S, Warner RR, Liu D, Palmedo H, Overton C, Jones B, Salem R: Radioembolization for unresectable neuroendocrine hepatic metastases using resin 90Y-microspheres: early results in 148 patients. Am J Clin Oncol 2008; 31(3):271-279.
(237) Kerkela E, Saarialho-Kere U: Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. Exp Dermatol 2003; 12(2):109-125.

(238) Khodjibekova M, Szyszko T, Khan S, Nijran K, Tait P, Al-Nahhas A: Selective internal radiation therapy with Yttrium-90 for unresectable liver tumours. Rev Recent Clin Trials 2007; 2(3):212-216.
(239) King J, Quinn R, Glenn DM, Janssen J, Tong D, Liaw W, Morris DL: Radioembolization with selective internal radiation microspheres for neuroendocrine liver metastases. Cancer 2008; 113(5):921-929.
(240) Klein M, Picard E, Vignaud JM, Marie B, Bresler L, Toussaint B, Weryha G, Duprez A, Leclere J: Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. J Endocrinol 1999; 161(1):41-49.
(241) Klöppel G: Neuroendocrine Tumors: Then and now; in: Modlin IM, Oberg K, (eds): A Century of advances in neuroendocrine tumor biology and treatment. Felsenstein C.C.C.P., 2007, pp 204-208.
(242) Kloppel G, Rindi G, Anlauf M, Perren A, Komminoth P: Site-specific biology and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Virchows Arch 2007; 451 Suppl 1:S9-27.
(243) Knappe UJ, Hagel C, Lisboa BW, Wilczak W, Ludecke DK, Saeger W: Expression of serine proteases and metalloproteinases in human pituitary adenomas and anterior pituitary lobe tissue. Acta Neuropathol 2003; 106(5):471-478.
(244) Knauper V, Cowell S, Smith B, Lopez-Otin C, O'Shea M, Morris H, Zardi L, Murphy G: The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. J Biol Chem 1997; 272(12):7608-7616.
(245) Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G: Biochemical characterization of human collagenase-3. J Biol Chem 1996; 271(3):1544-1550.
(246) Ko BK, Cho HR, Choi DW, Nam CW, Park CJ, Kim GY, Kim SS, Woo YJ, Huh J, Kim MY: Reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase in nodal metastasis of stomach cancer. J Korean Med Sci 1998; 13(3):286-290.
(247) Kolby L, Persson G, Franzen S, Ahren B: Randomized clinical trial of the effect of interferon alpha on survival in patients with disseminated midgut carcinoid tumours. Br J Surg 2003; 90(6):687-693.
(248) Kolomecki K, Stepien H, Bartos M, Kuzdak K: Usefulness of VEGF, MMP-2, MMP-3 and TIMP-2 serum level evaluation in patients with adrenal tumours. Endocr Regul 2001; 35(1):9-16.
(249) Kondo K, Kinoshita H, Ishikura H, Miyoshi T, Hirose T, Matsumori Y, Monden Y: Activation of matrix metalloproteinase-2 is correlated with invasiveness in thymic epithelial tumors. J Surg Oncol 2001; 76(3):169-175.
(250) Koolwijk P, Peters E, van d, V, Hornig C, Weich HA, Alitalo K, Hicklin DJ, Wu Y, Witte L, van H, V: Involvement of VEGFR-2 (kdr/flk-1) but not VEGFR-1 (flt-1) in VEGF-A and VEGF-C-induced tube formation by human microvascular endothelial cells in fibrin matrices in vitro. Angiogenesis 2001; 4(1):53-60.
(251) Kopfstein L, Veikkola T, Djonov VG, Baeriswyl V, Schomber T, Strittmatter K, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K, Christofori G: Distinct roles of vascular endothelial growth factor-D in lymphangiogenesis and metastasis. Am J Pathol 2007; 170(4):1348-1361.
(252) Korem S, Kraiem Z, Shiloni E, Yehezkel O, Sadeh O, Resnick MB: Increased expression of matrix metalloproteinase-2: a diagnostic marker but not prognostic marker of papillary thyroid carcinoma. Isr Med Assoc J 2002; 4(4):247-251.
(253) Kosem M, Tuncer I, Kotan C, Ibiloglu I, Ozturk M, Turkdogan MK: Significance of VEGF and microvascular density in gastric carcinoma. Hepatogastroenterology 2009; 56(93):1236-1240.
(254) Krenning EP, Valkema R, de Herder WW, Forrer F, de Jong M, Kwekkeboom DJ: Peptide Receptor Radionuclide Therapy of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors; in: Modlin IM, Oberg K, (eds): A Century of advances in neuroendocrine tumor biology and treatment. Felsenstein C.C.C.P., 2007, pp 434-443.
(255) Kubben FJ, Sier CF, van DW, Griffioen G, Hanemaaijer R, van d, V, van Krieken JH, Lamers CB, Verspaget HW: Matrix metalloproteinase-2 is a consistent prognostic factor in gastric cancer. Br J Cancer 2006; 94(7):1035-1040.
(256) Kulke MH: Gastrointestinal neuroendocrine tumors: a role for targeted therapies? Endocr Relat Cancer 2007; 14(2):207-219.
(257) Kulke MH, Freed E, Chiang DY, Philips J, Zahrieh D, Glickman JN, Shivdasani RA: 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.
(258) Kulke MH, Lenz HJ, Meropol NJ, Posey J, Ryan DP, Picus J, Bergsland E, Stuart K, Tye L, Huang X, Li JZ, Baum CM, Fuchs CS: Activity of sunitinib in patients with advanced neuroendocrine tumors. J Clin Oncol 2008; 26(20):3403-3410.
(259) Kulke MH, Scherubl H: Accomplishments in 2008 in the management of gastrointestinal neuroendocrine tumors. Gastrointest Cancer Res 2009; 3(5 Supplement 2):S62-S66.
(260) Kunnimalaiyaan M, Traeger K, Chen H: Conservation of the Notch1 signaling pathway in gastrointestinal carcinoid cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2005; 289(4):G636-G642.
(261) Kurahara H, Takao S, Maemura K, Shinchi H, Natsugoe S, Aikou T: Impact of vascular endothelial growth factor-C and -D expression in human pancreatic cancer: its relationship to lymph node metastasis. Clin Cancer Res 2004; 10(24):8413-8420.
(262) La Rosa S, Uccella S, Finzi G, Albarello L, Sessa F, Capella C: Localization of vascular endothelial growth factor and its receptors in digestive endocrine tumors: correlation with microvessel density and clinicopathologic features. Hum Pathol 2003; 34(1):18-27.
(263) Laakkonen P, Waltari M, Holopainen T, Takahashi T, Pytowski B, Steiner P, Hicklin D, Persaud K, Tonra JR, Witte L, Alitalo K: Vascular endothelial growth factor receptor 3 is involved in tumor angiogenesis and growth. Cancer Res 2007; 67(2):593-599.

(264) Lagercrantz J, Farnebo F, Larsson C, Tvrdik T, Weber G, Piehl F: A comparative study of the expression patterns for vegf, vegf-b/vrf and vegf-c in the developing and adult mouse. Biochim Biophys Acta 1998; 1398(2):157-163.
(265) Lambert E, Dasse E, Haye B, Petitfrere E: TIMPs as multifacial proteins. Crit Rev Oncol Hematol 2004; 49(3):187-198.
(266) Lamoreaux WJ, Fitzgerald ME, Reiner A, Hasty KA, Charles ST: Vascular endothelial growth factor increases release of gelatinase A and decreases release of tissue inhibitor of metalloproteinases by microvascular endothelial cells in vitro. Microvasc Res 1998; 55(1):29-42.
(267) Langenskiold M, Holmdahl L, Falk P, Ivarsson ML: Increased plasma MMP-2 protein expression in lymph node-positive patients with colorectal cancer. Int J Colorectal Dis 2005; 20(3):245-252.
(268) Lazaris AC, Tseleni-Balafouta S, Papathomas T, Brousalis T, Thomopoulou G, Agrogiannis G, Patsouris ES: Immunohistochemical investigation of angiogenic factors in parathyroid proliferative lesions. Eur J Endocrinol 2006; 154(6):827-833.
(269) Lee K, Park DJ, Choe G, Kim HH, Kim WH, Lee HS: Increased Intratumoral Lymphatic Vessel Density Correlates with Lymph Node Metastasis in Early Gastric Carcinoma. Ann Surg Oncol 2009.
(270) Leeman MF, Curran S, Murray GI: The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. Crit Rev Biochem Mol Biol 2002; 37(3):149-166.
(271) Leeman MF, McKay JA, Murray GI: Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer. J Clin Pathol 2002; 55(10):758-762.
(272) Leotlela PD, Jauch A, Holtgreve-Grez H, Thakker RV: Genetics of neuroendocrine and carcinoid tumours. Endocr Relat Cancer 2003; 10(4):437-450.
(273) Lesslie DP, Summy JM, Parikh NU, Fan F, Trevino JG, Sawyer TK, Metcalf CA, Shakespeare WC, Hicklin DJ, Ellis LM, Gallick GE: Vascular endothelial growth factor receptor-1 mediates migration of human colorectal carcinoma cells by activation of Src family kinases. Br J Cancer 2006; 94(11):1710-1717.
(274) Levy AD, Sobin LH: From the archives of the AFIP: Gastrointestinal carcinoids: imaging features with clinicopathologic comparison. Radiographics 2007; 27(1):237-257.
(275) Lewy-Trenda I, Wierzchniewska-Lawska A: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human thyroid tumors. Pol J Pathol 2002; 53(3):129-132.
(276) Li BH, Zhao P, Liu SZ, Yu YM, Han M, Wen JK: Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metallo-proteinase-2 in colorectal carcinoma invasion and metastasis. World J Gastroenterol 2005; 11(20):3046-3050.
(277) Li SG, Ye ZY, Zhao ZS, Tao HQ, Wang YY, Niu CY: Correlation of integrin beta3 mRNA and vascular endothelial growth factor protein expression profiles with the clinicopathological features and prognosis of gastric carcinoma. World J Gastroenterol 2008; 14(3):421-427.
(278) Li X, Aase K, Li H, von EG, Eriksson U: Isoform-specific expression of VEGF-B in normal tissues and tumors. Growth Factors 2001; 19(1):49-59.
(279) Li X, Tjwa M, Van H, I, Enholm B, Neven E, Paavonen K, Jeltsch M, Juan TD, Sievers RE, Chorianopoulos E, Wada H, Vanwildemeersch M, Noel A, Foidart JM, Springer ML, von DG, Dewerchin M, Blau HM, Alitalo K, Eriksson U, Carmeliet P, Moons L: Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; 28(9):1614-1620.
(280) Li Y, Zhang F, Nagai N, Tang Z, Zhang S, Scotney P, Lennartsson J, Zhu C, Qu Y, Fang C, Hua J, Matsuo O, Fong GH, Ding H, Cao Y, Becker KG, Nash A, Heldin CH, Li X: VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. J Clin Invest 2008; 118(3):913-923.
(281) Liabakk NB, Talbot I, Smith RA, Wilkinson K, Balkwill F: Matrix metalloprotease 2 (MMP-2) and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. Cancer Res 1996; 56(1):190-196.
(282) Lim YJ, Lee JK, Park CK, Song SY, Jang WY, Ha HY, Park DI, Lee KT, Paik SW, Yoo BC, Rhee JC: Prognostic value of VEGF in human pancreatic ductal adenocarcinoma. Korean J Intern Med 2004; 19(1):10-14.
(283) Lipponen P: Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. Endocr Relat Cancer 1999; 6(1):13-16.
(284) Liu DH, Zhang XY, Fan DM, Huang YX, Zhang JS, Huang WQ, Zhang YQ, Huang QS, Ma WY, Chai YB, Jin M: Expression of vascular endothelial growth factor and its role in oncogenesis of human gastric carcinoma. World J Gastroenterol 2001; 7(4):500-505.
(285) Loges S, Clausen H, Reichelt U, Bubenheim M, Erbersdobler A, Schurr P, Yekebas E, Schuch G, Izbicki J, Pantel K, Bokemeyer C, Fiedler W: Determination of microvessel density by quantitative real-time PCR in esophageal cancer: correlation with histologic methods, angiogenic growth factor expression, and lymph node metastasis. Clin Cancer Res 2007; 13(1):76-80.
(286) Lohela M, Helotera H, Haiko P, Dumont DJ, Alitalo K: Transgenic induction of vascular endothelial growth factor-C is strongly angiogenic in mouse embryos but leads to persistent lymphatic hyperplasia in adult tissues. Am J Pathol 2008; 173(6):1891-1901.
(287) Lollgen RM, Hessman O, Szabo E, Westin G, Akerstrom G: Chromosome 18 deletions are common events in classical midgut carcinoid tumors. Int J Cancer 2001; 92(6):812-815.
(288) Longatto-Filho A, Pinheiro C, Ferreira L, Scapulatempo C, Alves VA, Baltazar F, Schmitt F: Peritumoural, but not intratumoural, lymphatic vessel density and invasion correlate with colorectal carcinoma poor-outcome markers. Virchows Arch 2008; 452(2):133-138.

(289) Los M, Roodhart JM, Voest EE: Target practice: lessons from phase III trials with bevacizumab and vatalanib in the treatment of advanced colorectal cancer. Oncologist 2007; 12(4):443-450.
(290) Lu M, Jiang Y, Wang R: [The relationship of vascular endothelial growth factor and angiogenesis to the progression of gastric carcinoma]. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi 1998; 27(4):278-281.
(291) Lu ZQ, Li HG, Xie DR, Zhang HZ, Shen XM, Zeng YJ, Zeng H: [Expression and clinical significance of vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor receptor 3 in non-small cell lung carcinoma]. Ai Zheng 2005; 24(9):1132-1135.
(292) Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, ngelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De KB, Compernolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P: Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. Nat Med 2002; 8(8):831-840.
(293) Madoz-Gurpide J, Lopez-Serra P, Martinez-Torrecuadrada JL, Sanchez L, Lombardia L, Casal JI: Proteomics-based validation of genomic data: applications in colorectal cancer diagnosis. Mol Cell Proteomics 2006; 5(8):1471-1483.
(294) Maeta H, Ohgi S, Terada T: Protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinase 1 and 2 in papillary thyroid carcinomas. Virchows Arch 2001; 438(2):121-128.
(295) Maharaj AS, D'Amore PA: Roles for VEGF in the adult. Microvasc Res 2007; 74(2-3):100-113.
(296) Makinen T, Olofsson B, Karpanen T, Hellman U, Soker S, Klagsbrun M, Eriksson U, Alitalo K: Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. J Biol Chem 1999; 274(30):21217-21222.
(297) Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, Wise L, Mercer A, Kowalski H, Kerjaschki D, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K: Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. EMBO J 2001; 20(17):4762-4773.
(298) Manicone AM, McGuire JK: Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. Semin Cell Dev Biol 2008; 19(1):34-41.
(299) Mannello F, Gazzanelli G: Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications. Apoptosis 2001; 6(6):479-482.
(300) Marion-Audibert AM, Barel C, Gouysse G, Dumortier J, Pilleul F, Pourreyron C, Hervieu V, Poncet G, Lombard-Bohas C, Chayvialle JA, Partensky C, Scoazec JY: Low microvessel density is an unfavorable histoprognostic factor in pancreatic endocrine tumors. Gastroenterology 2003; 125(4):1094-1104.
(301) Martin MD, Matrisian LM: The other side of MMPs: protective roles in tumor progression. Cancer Metastasis Rev 2007; 26(3-4):717-724.
(302) Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS: Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. Blood 2001; 98(6):1904-1913.
(303) Massi D, Franchi A, Ketabchi S, Paglierani M, Pimpinelli N, Santucci M: Expression and prognostic significance of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in primary neuroendocrine carcinoma of the skin. Hum Pathol 2003; 34(1):80-88.
(304) Masson R, Lefebvre O, Noel A, Fahime ME, Chenard MP, Wendling C, Kebers F, LeMeur M, Dierich A, Foidart JM, Basset P, Rio MC: In vivo evidence that the stromelysin-3 metalloproteinase contributes in a paracrine manner to epithelial cell malignancy. J Cell Biol 1998; 140(6):1535-1541.
(305) Maula SM, Luukkaa M, Grenman R, Jackson D, Jalkanen S, Ristamaki R: Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region. Cancer Res 2003; 63(8):1920-1926.
(306) McCabe CJ, Boelaert K, Tannahill LA, Heaney AP, Stratford AL, Khaira JS, Hussain S, Sheppard MC, Franklyn JA, Gittoes NJ: Vascular endothelial growth factor, its receptor KDR/Flk-1, and pituitary tumor transforming gene in pituitary tumors. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87(9):4238-4244.
(307) Meredith JE, Jr., Fazeli B, Schwartz MA: The extracellular matrix as a cell survival factor. Mol Biol Cell 1993; 4(9):953-961.
(308) Michael M, Babic B, Khokha R, Tsao M, Ho J, Pintilie M, Leco K, Chamberlain D, Shepherd FA: Expression and prognostic significance of metalloproteinases and their tissue inhibitors in patients with small-cell lung cancer. J Clin Oncol 1999; 17(6):1802-1808.
(309) Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A: High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. Cell 1993; 72(6):835-846.
(310) Mimori K, Mori M, Shiraishi T, Fujie T, Baba K, Haraguchi M, Abe R, Ueo H, Akiyoshi T: Clinical significance of tissue inhibitor of metalloproteinase expression in gastric carcinoma. Br J Cancer 1997; 76(4):531-536.
(311) Miyake K, Shimada M, Nishioka M, Sugimoto K, Batmunkh E, Uto Y, Nagasawa H, Hori H: Downregulation of matrix metalloprotease-9 and urokinase plasminogen activator by TX-1877 results in decreased tumor growth and metastasis on xenograft model of rectal cancer. Cancer Chemother Pharmacol 2009; 64(5):885-892.
(312) Miyazaki T, Kato H, Nakajima M, Faried A, Takita J, Sohda M, Fukai Y, Yamaguchi S, Masuda N, Manda R, Fukuchi M, Ojima H, Tsukada K, Kuwano H: An immunohistochemical study of TIMP-3 expression in oesophageal squamous cell carcinoma. Br J Cancer 2004; 91(8):1556-1560.
(313) Modlin IM, Gustafsson BI, Drozdov I, Nadler B, Pfragner R, Kidd M: Principal component analysis, hierarchical clustering, and decision tree assessment of plasma mRNA and hormone levels as an early detection strategy for small intestinal neuroendocrine (carcinoid) tumors. Ann Surg Oncol 2009; 16(2):487-498.

(314) Modlin IM, Kidd M, Latich I, Zikusoka MN, Shapiro MD: Current status of gastrointestinal carcinoids. Gastroenterology 2005; 128(6):1717-1751.
(315) Modlin IM, Kidd M, Pfragner R, Eick GN, Champaneria MC: The functional characterization of normal and neoplastic human enterochromaffin cells. J Clin Endocrinol Metab 2006; 91(6):2340-2348.
(316) Modlin IM, Lye KD, Kidd M: A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. Cancer 2003; 97(4):934-959.
(317) Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, Caplin M, Delle FG, Kaltsas GA, Krenning EP, Moss SF, Nilsson O, Rindi G, Salazar R, Ruszniewski P, Sundin A: Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. Lancet Oncol 2008; 9(1):61-72.
(318) Modlin IM, Shapiro MD, Kidd M: Siegfried Oberndorfer: origins and perspectives of carcinoid tumors. Hum Pathol 2004; 35(12):1440-1451.
(319) Moehler M, Frings C, Mueller A, Gockel I, Schimanski CC, Biesterfeld S, Galle PR, Holtmann MH: VEGF-D expression correlates with colorectal cancer aggressiveness and is downregulated by cetuximab. World J Gastroenterol 2008; 14(26):4156-4167.
(320) Moller JE, Pellikka PA, Bernheim AM, Schaff HV, Rubin J, Connolly HM: Prognosis of carcinoid heart disease: analysis of 200 cases over two decades. Circulation 2005; 112(21):3320-3327.
(321) Moran A, Iniesta P, Garcia-Aranda C, de JC, az-Lopez A, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, az-Rubio E, Balibrea JL, Benito M: Clinical relevance of MMP-9, MMP-2, TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal cancer. Oncol Rep 2005; 13(1):115-120.
(322) Mori D, Yamasaki F, Shibaki M, Tokunaga O: Lateral peritumoral lymphatic vessel invasion can predict lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. Mod Pathol 2007; 20(6):694-700.
(323) Mori M, Mimori K, Sadanaga N, Inoue H, Tanaka Y, Mafune K, Ueo H, Barnard GF: Prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in esophageal carcinoma. Int J Cancer 2000; 88(4):575-578.
(324) Mould AW, Greco SA, Cahill MM, Tonks ID, Bellomo D, Patterson C, Zournazi A, Nash A, Scotney P, Hayward NK, Kay GF: Transgenic overexpression of vascular endothelial growth factor-B isoforms by endothelial cells potentiates postnatal vessel growth in vivo and in vitro. Circ Res 2005; 97(6):e60-e70.
(325) Mould AW, Tonks ID, Cahill MM, Pettit AR, Thomas R, Hayward NK, Kay GF: Vegfb gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. Arthritis Rheum 2003; 48(9):2660-2669.
(326) Mrena J, Wiksten JP, Nordling S, Kokkola A, Ristimaki A, Haglund C: MMP-2 but not MMP-9 associated with COX-2 and survival in gastric cancer. J Clin Pathol 2006; 59(6):618-623.
(327) Mroczko B, Lukaszewicz-Zajac M, Wereszczynska-Siemiatkowska U, Groblewska M, Gryko M, Kedra B, Jurkowska G, Szmitkowski M: Clinical significance of the measurements of serum matrix metalloproteinase-9 and its inhibitor (tissue inhibitor of metalloproteinase-1) in patients with pancreatic cancer: metalloproteinase-9 as an independent prognostic factor. Pancreas 2009; 38(6):613-618.
(328) Mueller J, Steiner C, Hofler H: Stromelysin-3 expression in noninvasive and invasive neoplasms of the urinary bladder. Hum Pathol 2000; 31(7):860-865.
(329) Murakami M, Zheng Y, Hirashima M, Suda T, Morita Y, Ooehara J, Ema H, Fong GH, Shibuya M: VEGFR1 tyrosine kinase signaling promotes lymphangiogenesis as well as angiogenesis indirectly via macrophage recruitment. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; 28(4):658-664.
(330) Murashige M, Miyahara M, Shiraishi N, Saito T, Kohno K, Kobayashi M: Enhanced expression of tissue inhibitors of metalloproteinases in human colorectal tumors. Jpn J Clin Oncol 1996; 26(5):303-309.
(331) Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG: Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. J Cell Physiol 1993; 157(2):351-358.
(332) Murray GI, Duncan ME, Arbuckle E, Melvin WT, Fothergill JE: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in gastric cancer. Gut 1998; 43(6):791-797.
(333) Mylona E, Alexandrou P, Giannopoulou I, Liapis G, Sofia M, Keramopoulos A, Nakopoulou L: The prognostic value of vascular endothelial growth factors (VEGFs)-A and -B and their receptor, VEGFR-1, in invasive breast carcinoma. Gynecol Oncol 2007; 104(3):557-563.
(334) Nagase H, Visse R, Murphy G: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res 2006; 69(3):562-573.
(335) Nagpal M, Nagpal K, Nagpal PN: A comparative debate on the various anti-vascular endothelial growth factor drugs: pegaptanib sodium (Macugen), ranibizumab (Lucentis) and bevacizumab (Avastin). Indian J Ophthalmol 2007; 55(6):437-439.
(336) Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF: Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. J Exp Med 2002; 196(11):1497-1506.
(337) Nakakura EK, Sriuranpong VR, Kunnimalaiyaan M, Hsiao EC, Schuebel KE, Borges MW, Jin N, Collins BJ, Nelkin BD, Chen H, Ball DW: Regulation of neuroendocrine differentiation in gastrointestinal carcinoid tumor cells by notch signaling. J Clin Endocrinol Metab 2005; 90(7):4350-4356.
(338) Nakamura ES, Koizumi K, Kobayashi M, Saiki I: Inhibition of lymphangiogenesis-related properties of murine lymphatic endothelial cells and lymph node metastasis of lung cancer by the matrix metalloproteinase inhibitor MMI270. Cancer Sci 2004; 95(1):25-31.
(339) Nakopoulou L, Tsirmpa I, Alexandrou P, Louvrou A, Ampela C, Markaki S, Davaris PS: MMP-2 protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. Breast Cancer Res Treat 2003; 77(2):145-155.
(340) Nash AD, Baca M, Wright C, Scotney PD: The biology of vascular endothelial growth factor-B (VEGF-B). Pulm Pharmacol Ther 2006; 19(1):61-69.

(341) Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. FASEB J 1999; 13(1):9-22.
(342) Nicolella D, Maione P, Gridelli C: Targeted therapies: focus on a new strategy for gastrointestinal tumors. Crit Rev Oncol Hematol 2003; 47(3):261-271.
(343) Niedergethmann M, Hildenbrand R, Wolf G, Verbeke CS, Richter A, Post S: Angiogenesis and cathepsin expression are prognostic factors in pancreatic adenocarcinoma after curative resection. Int J Pancreatol 2000; 28(1):31-39.
(344) Nielsen BS, Rank F, Lopez JM, Balbin M, Vizoso F, Lund LR, Dano K, Lopez-Otin C: Collagenase-3 expression in breast myofibroblasts as a molecular marker of transition of ductal carcinoma in situ lesions to invasive ductal carcinomas. Cancer Res 2001; 61(19):7091-7100.
(345) Nikiteas NI, Tzanakis N, Theodoropoulos G, Atsaves V, Christoni Z, Karakitsos P, Lazaris AC, Papachristodoulou A, Klonaris C, Gazouli M: Vascular endothelial growth factor and endoglin (CD-105) in gastric cancer. Gastric Cancer 2007; 10(1):12-17.
(346) Nilsson O: Pathology of Intestinal Carcinoids; in: Modlin IM, Oberg K, (eds): A Century of advances in neuroendocrine tumor biology and treatment. Felsenstein C.C.C.P., 2007, pp 268-275.
(347) Niveiro M, Aranda FI, Peiro G, Alenda C, Pico A: Immunohistochemical analysis of tumor angiogenic factors in human pituitary adenomas. Hum Pathol 2005; 36(10):1090-1095.
(348) Noel A, Boulay A, Kebers F, Kannan R, Hajitou A, Calberg-Bacq CM, Basset P, Rio MC, Foidart JM: Demonstration in vivo that stromelysin-3 functions through its proteolytic activity. Oncogene 2000; 19(12):1605-1612.
(349) Noel AC, Lefebvre O, Maquoi E, VanHoorde L, Chenard MP, Mareel M, Foidart JM, Basset P, Rio MC: Stromelysin-3 expression promotes tumor take in nude mice. J Clin Invest 1996; 97(8):1924-1930.
(350) Nomura H, Fujimoto N, Seiki M, Mai M, Okada Y: Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas. Int J Cancer 1996; 69(1):9-16.
(351) Nuttall RK, Sampieri CL, Pennington CJ, Gill SE, Schultz GA, Edwards DR: Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development. FEBS Lett 2004; 563(1-3):129-134.
(352) Ogata Y, Miura K, Ohkita A, Nagase H, Shirouzu K: Imbalance between matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 expression by tumor cells implicated in liver metastasis from colorectal carcinoma. Kurume Med J 2001; 48(3):211-218.
(353) Oh J, Seo DW, Diaz T, Wei B, Ward Y, Ray JM, Morioka Y, Shi S, Kitayama H, Takahashi C, Noda M, Stetler-Stevenson WG: Tissue inhibitors of metalloproteinase 2 inhibits endothelial cell migration through increased expression of RECK. Cancer Res 2004; 64(24):9062-9069.
(354) Ohashi K, Nemoto T, Nakamura K, Nemori R: Increased expression of matrix metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas. Cancer 2000; 88(10):2201-2209.
(355) Ohta S, Lai EW, Pang AL, Brouwers FM, Chan WY, Eisenhofer G, de KR, Ksinantova L, Breza J, Blazicek P, Kvetnansky R, Wesley RA, Pacak K: Downregulation of metastasis suppressor genes in malignant pheochromocytoma. Int J Cancer 2005; 114(1):139-143.
(356) Okita NT, Yamada Y, Takahari D, Hirashima Y, Matsubara J, Kato K, Hamaguchi T, Shirao K, Shimada Y, Taniguchi H, Shimoda T: Vascular endothelial growth factor receptor expression as a prognostic marker for survival in colorectal cancer. Jpn J Clin Oncol 2009; 39(9):595-600.
(357) Oliver G, Detmar M: The rediscovery of the lymphatic system: old and new insights into the development and biological function of the lymphatic vasculature. Genes Dev 2002; 16(7):773-783.
(358) Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K: Current biology of VEGF-B and VEGF-C. Curr Opin Biotechnol 1999; 10(6):528-535.
(359) Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U: Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(20):11709-11714.
(360) Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von EG, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U: Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1996; 93(6):2576-2581.
(361) Olofsson B, Pajusola K, von EG, Chilov D, Alitalo K, Eriksson U: Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. J Biol Chem 1996; 271(32):19310-19317.
(362) Ono T, Miki C: Factors influencing tissue concentration of vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma. Am J Gastroenterol 2000; 95(4):1062-1067.
(363) Onofri C, Theodoropoulou M, Losa M, Uhl E, Lange M, Arzt E, Stalla GK, Renner U: Localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors in normal and adenomatous pituitaries: detection of a non-endothelial function of VEGF in pituitary tumours. J Endocrinol 2006; 191(1):249-261.
(364) Onogawa S, Kitadai Y, Amioka T, Kodama M, Cho S, Kuroda T, Ochiumi T, Kimura S, Kuwai T, Tanaka S, Chayama K: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D in early gastric carcinoma: correlation with clinicopathological parameters. Cancer Lett 2005; 226(1):85-90.
(365) Onogawa S, Kitadai Y, Tanaka S, Kuwai T, Kimura S, Chayama K: Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph node metastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma. Cancer Sci 2004; 95(1):32-39.

(366) Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI: Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. Blood Cells Mol Dis 2007; 38(3):258-268.
(367) Overall CM, Kleifeld O: Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy. Br J Cancer 2006; 94(7):941-946.
(368) Ozdemir F, Akdogan R, Aydin F, Reis A, Kavgaci H, Gul S, Akdogan E: The effects of VEGF and VEGFR-2 on survival in patients with gastric cancer. J Exp Clin Cancer Res 2006; 25(1):83-88.
(369) Paavonen K, Horelli-Kuitunen N, Chilov D, Kukk E, Pennanen S, Kallioniemi OP, Pajusola K, Olofsson B, Eriksson U, Joukov V, Palotie A, Alitalo K: Novel human vascular endothelial growth factor genes VEGF-B and VEGF-C localize to chromosomes 11q13 and 4q34, respectively. Circulation 1996; 93(6):1079-1082.
(370) Padera TP, Kadambi A, di TE, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK: Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. Science 2002; 296(5574):1883-1886.
(371) Panelos J, Batistatou A, Paglierani M, Zioga A, Maio V, Santi R, Pimpinelli N, De G, V, Santucci M, Massi D: Expression of Notch-1 and alteration of the E-cadherin/beta-catenin cell adhesion complex are observed in primary cutaneous neuroendocrine carcinoma (Merkel cell carcinoma). Mod Pathol 2009; 22(7):959-968.
(372) Panzuto F, Capurso G, Delle Fave G: Medical treatment of gastro-entero-pancreatic endocrine tumors; in: Modlin IM, Oberg K, (eds): A Century of advances in neuroendocrine tumor biology and treatment. Felsenstein C.C.C.P., 2007, pp 364-369.
(373) Papadopoulou S, Scorilas A, Arnogianaki N, Papapanayiotou B, Tzimogiani A, Agnantis N, Talieri M: Expression of gelatinase-A (MMP-2) in human colon cancer and normal colon mucosa. Tumour Biol 2001; 22(6):383-389.
(374) Papazafiropoulou A, Tentolouris N: Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. Hippokratia 2009; 13(2):76-82.
(375) Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N: Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. J Biol Chem 1994; 269(41):25646-25654.
(376) Parr C, Jiang WG: Quantitative analysis of lymphangiogenic markers in human colorectal cancer. Int J Oncol 2003; 23(2):533-539.
(377) Partanen TA, Alitalo K, Miettinen M: Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor receptor 3 in 185 vascular tumors. Cancer 1999; 86(11):2406-2412.
(378) Partanen TA, Arola J, Saaristo A, Jussila L, Ora A, Miettinen M, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K: VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. FASEB J 2000; 14(13):2087-2096.
(379) Pavel ME, Hassler G, Baum U, Hahn EG, Lohmann T, Schuppan D: Circulating levels of angiogenic cytokines can predict tumour progression and prognosis in neuroendocrine carcinomas. Clin Endocrinol (Oxf) 2005; 62(4):434-443.
(380) Pei D, Weiss SJ: Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. Nature 1995; 375(6528):244-247.
(381) Pelosi G, Scarpa A, Veronesi G, Spaggiari L, Del CB, Moore PS, Maisonneuve P, Sonzogni A, Masullo M, Viale G: A subset of high-grade pulmonary neuroendocrine carcinomas shows up-regulation of matrix metalloproteinase-7 associated with nuclear beta-catenin immunoreactivity, independent of EGFR and HER-2 gene amplification or expression. Virchows Arch 2005; 447(6):969-977.
(382) Pender SL, MacDonald TT: Matrix metalloproteinases and the gut - new roles for old enzymes. Curr Opin Pharmacol 2004; 4(6):546-550.
(383) Pepper MS, Skobe M: Lymphatic endothelium: morphological, molecular and functional properties. J Cell Biol 2003; 163(2):209-213.
(384) Perez-Martinez L, Jaworski DM: Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 promotes neuronal differentiation by acting as an anti-mitogenic signal. J Neurosci 2005; 25(20):4917-4929.
(385) Pesta M, Topolcan O, Holubec L, Jr., Rupert K, Cerna M, Holubec LS, Treska V, Finek J, Cerny R: Clinicopathological assessment and quantitative estimation of the matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-7 and the inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in colorectal carcinoma tissue samples. Anticancer Res 2007; 27(4A):1863-1867.
(386) Peters KG, de VC, Williams LT: Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. Proc Natl Acad Sci U S A 1993; 90(19):8915-8919.
(387) Peterson JT: The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. Cardiovasc Res 2006; 69(3):677-687.
(388) Phan AT, Yao JC, Evans DB: Treatment options for metastatic neuroendocrine tumors. Surgery 2008; 144(6):895-898.
(389) Plockinger U, Couvelard A, Falconi M, Sundin A, Salazar R, Christ E, de Herder WW, Gross D, Knapp WH, Knigge UP, Kulke MH, Pape UF: Consensus guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine tumours: well-differentiated tumour/carcinoma of the appendix and goblet cell carcinoma. Neuroendocrinology 2008; 87(1):20-30.
(390) Plockinger U, Rindi G, Arnold R, Eriksson B, Krenning EP, de Herder WW, Goede A, Caplin M, Oberg K, Reubi JC, Nilsson O, Delle FG, Ruszniewski P, Ahlman H, Wiedenmann B: Guidelines for the diagnosis and treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumours. A consensus statement on behalf of the European Neuroendocrine Tumour Society (ENETS). Neuroendocrinology 2004; 80(6):394-424.

(391) Polette M, Gilles C, de BS, Gruenert D, Tournier JM, Birembaut P: Association of fibroblastoid features with the invasive phenotype in human bronchial cancer cell lines. Clin Exp Metastasis 1998; 16(2):105-112.
(392) Poncet G, Villaume K, Walter T, Pourreyron C, Theillaumas A, Lepinasse F, Hervieu V, Cordier-Bussat M, Scoazec JY, Roche C: Angiogenesis and Tumor Progression in Neuroendocrine Digestive Tumors. J Surg Res 2008.
(393) Porte H, Triboulet JP, Kotelevets L, Carrat F, Prevot S, Nordlinger B, DiGioia Y, Wurtz A, Comoglio P, Gespach C, Chastre E: Overexpression of stromelysin-3, BM-40/SPARC, and MET genes in human esophageal carcinoma: implications for prognosis. Clin Cancer Res 1998; 4(6):1375-1382.
(394) Pourgholami MH, Morris DL: Inhibitors of vascular endothelial growth factor in cancer. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem 2008; 6(4):343-347.
(395) Powe DG, Brough JL, Carter GI, Bailey EM, Stetler-Stevenson WG, Turner DR, Hewitt RE: TIMP-3 mRNA expression is regionally increased in moderately and poorly differentiated colorectal adenocarcinoma. Br J Cancer 1997; 75(11):1678-1683.
(396) Pryczynicz A, Guzinska-Ustymowicz K, Dymicka-Piekarska V, Czyzewska J, Kemona A: Expression of matrix metalloproteinase 9 in pancreatic ductal carcinoma is associated with tumor metastasis formation. Folia Histochem Cytobiol 2007; 45(1):37-40.
(397) Qi JH, Ebrahem Q, Moore N, Murphy G, Claesson-Welsh L, Bond M, Baker A, nand-Apte B: A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. Nat Med 2003; 9(4):407-415.
(398) Raff MC: Social controls on cell survival and cell death. Nature 1992; 356(6368):397-400.
(399) Raffetto JD, Khalil RA: Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. Biochem Pharmacol 2008; 75(2):346-359.
(400) Ramage JK, Goretzki PE, Manfredi R, Komminoth P, Ferone D, Hyrdel R, Kaltsas G, Kelestimur F, Kvols L, Scoazec JY, Garcia MI, Caplin ME: Consensus guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine tumours: well-differentiated colon and rectum tumour/carcinoma. Neuroendocrinology 2008; 87(1):31-39.
(401) Raymond E, Faivre S, Hammel P, Ruszniewski P: Sunitinib paves the way for targeted therapies in neuroendocrine tumors. Target Oncol 2009.
(402) Ree AH, Florenes VA, Berg JP, Maelandsmo GM, Nesland JM, Fodstad O: High levels of messenger RNAs for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) in primary breast carcinomas are associated with development of distant metastases. Clin Cancer Res 1997; 3(9):1623-1628.
(403) Rehfeld JF: The new biology of gastrointestinal hormones. Physiol Rev 1998; 78(4):1087-1108.
(404) Reichelt M, Shi S, Hayes M, Kay G, Batch J, Gole GA, Browning J: Vascular endothelial growth factor-B and retinal vascular development in the mouse. Clin Experiment Ophthalmol 2003; 31(1):61-65.
(405) Reichenberger F, Eickelberg O, Wyser C, Perruchoud AP, Roth M, Tamm M: Distinct endobronchial expression of matrix-metalloproteinases (MMP) and their endogenous inhibitors in lung cancer. Swiss Med Wkly 2001; 131(19-20):273-279.
(406) Remacle A, McCarthy K, Noel A, Maguire T, McDermott E, O'Higgins N, Foidart JM, Duffy MJ: High levels of TIMP-2 correlate with adverse prognosis in breast cancer. Int J Cancer 2000; 89(2):118-121.
(407) Ricci F, Kern SE, Hruban RH, Iacobuzio-Donahue CA: Stromal responses to carcinomas of the pancreas: juxtatumoral gene expression conforms to the infiltrating pattern and not the biologic subtype. Cancer Biol Ther 2005; 4(3):302-307.
(408) Riede U-N, Klöppel G: Diffuses neuroendokrines System; in: Riede U-N, Schaefer H-E, (eds): Allgemeine und spezielle Pathologie. Stuttgart, Germany, Thieme, 2001, pp 1011-1014.
(409) Rigg AS, Lemoine NR: Adenoviral delivery of TIMP1 or TIMP2 can modify the invasive behavior of pancreatic cancer and can have a significant antitumor effect in vivo. Cancer Gene Ther 2001; 8(11):869-878.
(410) Rindi G, Kloppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, Erikssson B, Falchetti A, Falconi M, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B: TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. Virchows Arch 2006; 449(4):395-401.
(411) Rindi G, Kloppel G, Couvelard A, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B: TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. Virchows Arch 2007; 451(4):757-762.
(412) Rio MC: From a unique cell to metastasis is a long way to go: clues to stromelysin-3 participation. Biochimie 2005; 87(3-4):299-306.
(413) Rissanen TT, Markkanen JE, Gruchala M, Heikura T, Puranen A, Kettunen MI, Kholova I, Kauppinen RA, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K, Yla-Herttuala S: VEGF-D is the strongest angiogenic and lymphangiogenic effector among VEGFs delivered into skeletal muscle via adenoviruses. Circ Res 2003; 92(10):1098-1106.
(414) Roca F, Mauro LV, Morandi A, Bonadeo F, Vaccaro C, Quintana GO, Specterman S, de Kier Joffe EB, Pallotta MG, Puricelli LI, Lastiri J: Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, MMPs (7 and 9), and TIMPs (1 and 2) in patients with colorectal carcinoma. J Surg Oncol 2006; 93(2):151-160.
(415) Roche A, Girish BV, de BT, Ducreux M, Elias D, Laplanche A, Boige V, Schlumberger M, Ruffle P, Baudin E: Prognostic factors for chemoembolization in liver metastasis from endocrine tumors. Hepatogastroenterology 2004; 51(60):1751-1756.

(416) Roeb E, Dietrich CG, Winograd R, Arndt M, Breuer B, Fass J, Schumpelick V, Matern S: Activity and cellular origin of gelatinases in patients with colon and rectal carcinoma differential activity of matrix metalloproteinase-9. Cancer 2001; 92(10):2680-2691.
(417) Rorstad O: Prognostic indicators for carcinoid neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. J Surg Oncol 2005; 89(3):151-160.
(418) Roskoski R, Jr.: VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. Biochem Biophys Res Commun 2008; 375(3):287-291.
(419) Roskoski R, Jr.: Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. Crit Rev Oncol Hematol 2007; 62(3):179-213.
(420) Rubbia-Brandt L, Terris B, Giostra E, Dousset B, Morel P, Pepper MS: Lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor-C expression correlate with malignant behavior in human pancreatic endocrine tumors. Clin Cancer Res 2004; 10(20):6919-6928.
(421) Rundhaug JE: Matrix metalloproteinases and angiogenesis. J Cell Mol Med 2005; 9(2):267-285.
(422) Ruszniewski P, Delle FG, Cadiot G, Komminoth P, Chung D, Kos-Kudla B, Kianmanesh R, Hochhauser D, Arnold R, Ahlman H, Pauwels S, Kwekkeboom DJ, Rindi G: Well-differentiated gastric tumors/carcinomas. Neuroendocrinology 2006; 84(3):158-164.
(423) Rutkowski JM, Boardman KC, Swartz MA: Characterization of lymphangiogenesis in a model of adult skin regeneration. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006; 291(3):H1402-H1410.
(424) Saad RS, Lindner JL, Liu Y, Silverman JF: Lymphatic vessel density as prognostic marker in esophageal adenocarcinoma. Am J Clin Pathol 2009; 131(1):92-98.
(425) Salven P, Lymboussaki A, Heikkila P, Jaaskela-Saari H, Enholm B, Aase K, von EG, Eriksson U, Alitalo K, Joensuu H: Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. Am J Pathol 1998; 153(1):103-108.
(426) Sang QX: Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. Cell Res 1998; 8(3):171-177.
(427) Sartelet H, Decaussin M, Devouassoux G, Nawrocki-Raby B, Brichon PY, Brambilla C, Brambilla E: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (VEGF-R1 [Flt-1] and VEGF-R2 [KDR/Flk-1]) in tumorlets and in neuroendocrine cell hyperplasia of the lung. Hum Pathol 2004; 35(10):1210-1217.
(428) Sato Y: VEGFR1 for lymphangiogenesis: an alternative signaling pathway? Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008; 28(4):604-605.
(429) Schafermeyer A, Gratzl M, Rad R, Dossumbekova A, Sachs G, Prinz C: Isolation and receptor profiling of ileal enterochromaffin cells. Acta Physiol Scand 2004; 182(1):53-62.
(430) Schmeisser A, Christoph M, Augstein A, Marquetant R, Kasper M, Braun-Dullaeus RC, Strasser RH: Apoptosis of human macrophages by Flt-4 signaling: implications for atherosclerotic plaque pathology. Cardiovasc Res 2006; 71(4):774-784.
(431) Schnirer II, Yao JC, Ajani JA: Carcinoid--a comprehensive review. Acta Oncol 2003; 42(7):672-692.
(432) Scholzen T, Gerdes J: The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol 2000; 182(3):311-322.
(433) Schwandner O, Schlamp A, Broll R, Bruch HP: Clinicopathologic and prognostic significance of matrix metalloproteinases in rectal cancer. Int J Colorectal Dis 2007; 22(2):127-136.
(434) Shao XJ, Lu WQ, Liu C: Different effects of angiogenesis inhibitors IFN-alpha and TIMP-1 on lymphangiogenesis. Lymphology 2008; 41(2):64-74.
(435) Sharma R, Chattopadhyay TK, Mathur M, Ralhan R: Prognostic significance of stromelysin-3 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 in esophageal cancer. Oncology 2004; 67(3-4):300-309.
(436) Shebani KO, Souba WW, Finkelstein DM, Stark PC, Elgadi KM, Tanabe KK, Ott MJ: Prognosis and survival in patients with gastrointestinal tract carcinoid tumors. Ann Surg 1999; 229(6):815-821.
(437) Shibuya M: Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. BMB Rep 2008; 41(4):278-286.
(438) Shibuya M: Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis. J Biochem Mol Biol 2006; 39(5):469-478.
(439) Shibuya M, Claesson-Welsh L: Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Exp Cell Res 2006; 312(5):549-560.
(440) Shida A, Fujioka S, Ishibashi Y, Kobayashi K, Nimura H, Mitsumori N, Suzuki Y, Kawakami M, Urashima M, Yanaga K: Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in gastric carcinoma. World J Surg 2005; 29(12):1600-1607.
(441) Shida A, Fujioka S, Kobayashi K, Ishibashi Y, Nimura H, Mitsumori N, Yanaga K: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and -D in gastric carcinoma. Int J Clin Oncol 2006; 11(1):38-43.
(442) Shim KN, Jung SA, Joo YH, Yoo K: Clinical significance of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric cancer. J Gastroenterol 2007; 42(2):120-128.
(443) Shin JE, Jung SA, Kim SE, Joo YH, Shim KN, Kim TH, Yoo K, Moon IH: [Expression of MMP-2, HIF-1alpha and VEGF in colon adenoma and colon cancer]. Korean J Gastroenterol 2007; 50(1):9-18.
(444) Siegenthaler W: Siegenthalers Differentialdiagnose. ed 19, Stuttgart, Thieme, 2005.
(445) Silvestre JS, Tamarat R, Ebrahimian TG, Le-Roux A, Clergue M, Emmanuel F, Duriez M, Schwartz B, Branellec D, Levy BI: Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. Circ Res 2003; 93(2):114-123.
(446) Simiantonaki N, Taxeidis M, Jayasinghe C, Kirkpatrick CJ: Epithelial expression of VEGF receptors in colorectal carcinomas and their relationship to metastatic status. Anticancer Res 2007; 27(5A):3245-3250.

(447) Sipos B, Klapper W, Kruse ML, Kalthoff H, Kerjaschki D, Kloppel G: Expression of lymphangiogenic factors and evidence of intratumoral lymphangiogenesis in pancreatic endocrine tumors. Am J Pathol 2004; 165(4):1187-1197.
(448) Sipos B, Kojima M, Tiemann K, Klapper W, Kruse ML, Kalthoff H, Schniewind B, Tepel J, Weich H, Kerjaschki D, Kloppel G: Lymphatic spread of ductal pancreatic adenocarcinoma is independent of lymphangiogenesis. J Pathol 2005; 207(3):301-312.
(449) Skobe M, Hawighorst T, Jackson DG, Prevo R, Janes L, Velasco P, Riccardi L, Alitalo K, Claffey K, Detmar M: Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. Nat Med 2001; 7(2):192-198.
(450) Skoglund J, Emterling A, Arbman G, Anglard P, Sun XF: Clinicopathological significance of stromelysin-3 expression in colorectal cancer. Oncology 2004; 67(1):67-72.
(451) Sogawa K, Kondo K, Fujino H, Takahashi Y, Miyoshi T, Sakiyama S, Mukai K, Monden Y: Increased expression of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is correlated with poor prognostic variables in patients with thymic epithelial tumors. Cancer 2003; 98(9):1822-1829.
(452) Soni S, Mathur M, Shukla NK, Deo SV, Ralhan R: Stromelysin-3 expression is an early event in human oral tumorigenesis. Int J Cancer 2003; 107(2):309-316.
(453) Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K: Lymphangiogenesis and cancer metastasis. Nat Rev Cancer 2002; 2(8):573-583.
(454) Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, Achen MG: VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. Nat Med 2001; 7(2):186-191.
(455) Stacker SA, Williams RA, Achen MG: Lymphangiogenic growth factors as markers of tumor metastasis. APMIS 2004; 112(7-8):539-549.
(456) Stamenkovic I: Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. Semin Cancer Biol 2000; 10(6):415-433.
(457) Stearns ME, Wang M, Hu Y, Kim G, Garcia FU: Expression of a flt-4 (VEGFR3) splicing variant in primary human prostate tumors. VEGF D and flt-4t(Delta773-1081) overexpression is diagnostic for sentinel lymph node metastasis. Lab Invest 2004; 84(6):785-795.
(458) Steinmuller T, Kianmanesh R, Falconi M, Scarpa A, Taal B, Kwekkeboom DJ, Lopes JM, Perren A, Nikou G, Yao J, le Fave GF, O'Toole D: Consensus guidelines for the management of patients with liver metastases from digestive (neuro)endocrine tumors: foregut, midgut, hindgut, and unknown primary. Neuroendocrinology 2008; 87(1):47-62.
(459) Sternlicht MD, Werb Z: How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol 2001; 17:463-516.
(460) Stetler-Stevenson WG: Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. Sci Signal 2008; 1(27):re6.
(461) Stetler-Stevenson WG: Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. J Clin Invest 1999; 103(9):1237-1241.
(462) Stetler-Stevenson WG: The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. Cancer Metastasis Rev 2008; 27(1):57-66.
(463) Stetler-Stevenson WG, Seo DW: TIMP-2: an endogenous inhibitor of angiogenesis. Trends Mol Med 2005; 11(3):97-103.
(464) Stinchcombe TE, Socinski MA: Current treatments for advanced stage non-small cell lung cancer. Proc Am Thorac Soc 2009; 6(2):233-241.
(465) Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P: VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. Bioessays 2004; 26(9):943-954.
(466) Stridsberg M, Oberg K, Li Q, Engstrom U, Lundqvist G: Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. J Endocrinol 1995; 144(1):49-59.
(467) Strizzi L, Catalano A, Vianale G, Orecchia S, Casalini A, Tassi G, Puntoni R, Mutti L, Procopio A: Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma. J Pathol 2001; 193(4):468-475.
(468) Su JL, Yang PC, Shih JY, Yang CY, Wei LH, Hsieh CY, Chou CH, Jeng YM, Wang MY, Chang KJ, Hung MC, Kuo ML: The VEGF-C/Flt-4 axis promotes invasion and metastasis of cancer cells. Cancer Cell 2006; 9(3):209-223.
(469) Su JL, Yen CJ, Chen PS, Chuang SE, Hong CC, Kuo IH, Chen HY, Hung MC, Kuo ML: The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. Br J Cancer 2007; 96(4):541-545.
(470) Sun FY, Guo X: Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. J Neurosci Res 2005; 79(1-2):180-184.
(471) Sun Y, Jin K, Childs JT, Xie L, Mao XO, Greenberg DA: Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: evidence from knockout mice and growth factor administration. Dev Biol 2006; 289(2):329-335.
(472) Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA: VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. J Clin Invest 2003; 111(12):1843-1851.
(473) Sundar SS, Ganesan TS: Role of lymphangiogenesis in cancer. J Clin Oncol 2007; 25(27):4298-4307.
(474) Sutnar A, Pesta M, Liska V, Treska V, Skalicky T, Kormunda S, Topolcan O, Cerny R, Holubec L, Jr.: Clinical relevance of the expression of mRNA of MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 and CEA tissue samples from colorectal liver metastases. Tumour Biol 2007; 28(5):247-252.

(475) Takahashi E, Tateyama H, Akatsu H, Fukai I, Yamakawa Y, Fujii Y, Eimoto T: Expression of matrix metalloproteinases 2 and 7 in tumor cells correlates with the World Health Organization classification subtype and clinical stage of thymic epithelial tumors. Hum Pathol 2003; 34(12):1253-1258.
(476) Takahashi Y, Akishima-Fukasawa Y, Kobayashi N, Sano T, Kosuge T, Nimura Y, Kanai Y, Hiraoka N: Prognostic value of tumor architecture, tumor-associated vascular characteristics, and expression of angiogenic molecules in pancreatic endocrine tumors. Clin Cancer Res 2007; 13(1):187-196.
(477) Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, Kitadai Y, Bucana CD, Ellis LM: Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. Clin Cancer Res 1996; 2(10):1679-1684.
(478) Takahashi Y, Mai M: [Significance of angiogenesis and clinical application of anti-angiogenesis]. Nippon Geka Gakkai Zasshi 2001; 102(5):381-384.
(479) Takahashi Y, Onda M, Tanaka N, Seya T: Establishment and characterization of two new rectal neuroendocrine cell carcinoma cell lines. Digestion 2000; 62(4):262-270.
(480) Takekoshi K, Isobe K, Yashiro T, Hara H, Ishii K, Kawakami Y, Nakai T, Okuda Y: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cognate receptors in human pheochromocytomas. Life Sci 2004; 74(7):863-871.
(481) Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K: The biology of vascular endothelial growth factors. Cardiovasc Res 2005; 65(3):550-563.
(482) Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomaki A, Suchting S, Wirzenius M, Waltari M, Hellstrom M, Schomber T, Peltonen R, Freitas C, Duarte A, Isoniemi H, Laakkonen P, Christofori G, Yla-Herttuala S, Shibuya M, Pytowski B, Eichmann A, Betsholtz C, Alitalo K: Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. Nature 2008; 454(7204):656-660.
(483) Tan G, Cioc AM, Perez-Montiel D, Ellison EC, Frankel WL: Microvascular density does not correlate with histopathology and outcome in neuroendocrine tumors of the pancreas. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2004; 12(1):31-35.
(484) Tanaka K, Kurebayashi J, Sonoo H, Otsuki T, Yamamoto Y, Ohkubo S, Yamamoto S, Shimozuma K: Expression of vascular endothelial growth factor family messenger RNA in diseased thyroid tissues. Surg Today 2002; 32(9):761-768.
(485) Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T: Correlation between expression of vascular endothelial growth factor and tumor vascularity, and patient outcome in human gastric carcinoma. J Clin Oncol 1997; 15(2):826-832.
(486) Tanno S, Ohsaki Y, Nakanishi K, Toyoshima E, Kikuchi K: Human small cell lung cancer cells express functional VEGF receptors, VEGFR-2 and VEGFR-3. Lung Cancer 2004; 46(1):11-19.
(487) Terris B, Meddeb M, Marchio A, Danglot G, Flejou JF, Belghiti J, Ruszniewski P, Bernheim A: Comparative genomic hybridization analysis of sporadic neuroendocrine tumors of the digestive system. Genes Chromosomes Cancer 1998; 22(1):50-56.
(488) Terris B, Scoazec JY, Rubbia L, Bregeaud L, Pepper MS, Ruszniewski P, Belghiti J, Flejou J, Degott C: Expression of vascular endothelial growth factor in digestive neuroendocrine tumours. Histopathology 1998; 32(2):133-138.
(489) Thewes M, Pohlmann G, Atkinson M, Mueller J, Putz B, Hofler H: Stromelysin-3 (ST-3) mRNA expression in colorectal carcinomas. Localization and clinicopathologic correlations. Diagn Mol Pathol 1996; 5(4):284-290.
(490) Thiele W, Sleeman JP: Tumor-induced lymphangiogenesis: a target for cancer therapy? J Biotechnol 2006; 124(1):224-241.
(491) Tian X, Song S, Wu J, Meng L, Dong Z, Shou C: Vascular endothelial growth factor: acting as an autocrine growth factor for human gastric adenocarcinoma cell MGC803. Biochem Biophys Res Commun 2001; 286(3):505-512.
(492) Tian XF, Zhang XW, Chen RX, Wang JW, Zhang D: [Clinical significance of expression of VEGF and bFGF in thyroid carcinoma]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi 2004; 42(14):864-866.
(493) Tomassetti P, Campana D, Piscitelli L, Casadei R, Nori F, Brocchi E, Santini D, Pezzilli R, Corinaldesi R: Endocrine tumors of the ileum: factors correlated with survival. Neuroendocrinology 2006; 83(5-6):380-386.
(494) Tomita T: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in thyroid C-cells and medullary thyroid carcinomas. Histopathology 1997; 31(2):150-156.
(495) Tomita T, Iwata K: Gelatinases and inhibitors of gelatinases in pancreatic islets and islet cell tumors. Mod Pathol 1997; 10(1):47-54.
(496) Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JA: Angiogenesis in endocrine tumors. Endocr Rev 2003; 24(5):600-632.
(497) Unsal D, Akyurek N, Uner A, Erpolat OP, Han U, Akmansu M, Mentes BB, Dursun A: Gelatinase B expression as a prognostic factor in patients with stage II/III rectal carcinoma treated by postoperative adjuvant therapy. Am J Clin Oncol 2008; 31(1):55-63.
(498) Urbanski SJ, Edwards DR, Hershfield N, Huchcroft SA, Shaffer E, Sutherland L, Kossakowska AE: Expression pattern of metalloproteinases and their inhibitors changes with the progression of human sporadic colorectal neoplasia. Diagn Mol Pathol 1993; 2(2):81-89.
(499) Van Buren G., Rashid A, Yang AD, Abdalla EK, Gray MJ, Liu W, Somcio R, Fan F, Camp ER, Yao JC, Ellis LM: The development and characterization of a human midgut carcinoid cell line. Clin Cancer Res 2007; 13(16):4704-4712.

(500) Van der Auwera I, Cao Y, Tille JC, Pepper MS, Jackson DG, Fox SB, Harris AL, Dirix LY, Vermeulen PB: First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. Br J Cancer 2006; 95(12):1611-1625.
(501) van der Schaft DW, Pauwels P, Hulsmans S, Zimmermann M, van de Poll-Franse LV, Griffioen AW: Absence of lymphangiogenesis in ductal breast cancer at the primary tumor site. Cancer Lett 2007; 254(1):128-136.
(502) Van Lint P, Libert C: Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. J Leukoc Biol 2007; 82(6):1375-1381.
(503) van Vilsteren FG, Baskin-Bey ES, Nagorney DM, Sanderson SO, Kremers WK, Rosen CB, Gores GJ, Hobday TJ: Liver transplantation for gastroenteropancreatic neuroendocrine cancers: Defining selection criteria to improve survival. Liver Transpl 2006; 12(3):448-456.
(504) Van LP, Libert C: Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. J Leukoc Biol 2007; 82(6):1375-1381.
(505) Veikkola T, Jussila L, Makinen T, Karpanen T, Jeltsch M, Petrova TV, Kubo H, Thurston G, McDonald DM, Achen MG, Stacker SA, Alitalo K: Signalling via vascular endothelial growth factor receptor-3 is sufficient for lymphangiogenesis in transgenic mice. EMBO J 2001; 20(6):1223-1231.
(506) Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K: Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. Cancer Res 2000; 60(2):203-212.
(507) Verheijen R, Kuijpers HJ, van DR, Beck JL, van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC: Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. J Cell Sci 1989; 92 (Pt 4):531-540.
(508) Vieira JM, Santos SC, Espadinha C, Correia I, Vag T, Casalou C, Cavaco BM, Catarino AL, Dias S, Leite V: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in thyroid carcinomas of follicular origin: a potential autocrine loop. Eur J Endocrinol 2005; 153(5):701-709.
(509) Vihinen P, Kahari VM: Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. Int J Cancer 2002; 99(2):157-166.
(510) Vikman S, Essand M, Cunningham JL, de la TM, Oberg K, Totterman TH, Giandomenico V: Gene expression in midgut carcinoid tumors: potential targets for immunotherapy. Acta Oncol 2005; 44(1):32-40.
(511) Visse R, Nagase H: Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. Circ Res 2003; 92(8):827-839.
(512) Vizoso FJ, Gonzalez LO, Corte MD, Rodriguez JC, Vazquez J, Lamelas ML, Junquera S, Merino AM, Garcia-Muniz JL: Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. Br J Cancer 2007; 96(6):903-911.
(513) Voland P, Besig S, Rad R, Braun T, Baur DM, Perren A, Langer R, Hofler H, Prinz C: Correlation of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase Expression in Ileal Carcinoids, Lymph Nodes and Liver Metastasis with Prognosis and Survival. Neuroendocrinology 2008; 89(1):66-78.
(514) von Marschall Z, Cramer T, Hocker M, Burde R, Plath T, Schirner M, Heidenreich R, Breier G, Riecken EO, Wiedenmann B, Rosewicz S: De novo expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer: evidence for an autocrine mitogenic loop. Gastroenterology 2000; 119(5):1358-1372.
(515) von Marschall Z, Riecken EO, Rosewicz S: Stromelysin 3 is overexpressed in human pancreatic carcinoma and regulated by retinoic acid in pancreatic carcinoma cell lines. Gut 1998; 43(5):692-698.
(516) von Marschall Z, Scholz A, Cramer T, Schafer G, Schirner M, Oberg K, Wiedenmann B, Hocker M, Rosewicz S: Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. J Natl Cancer Inst 2003; 95(6):437-448.
(517) von Marschall Z, Scholz A, Stacker SA, Achen MG, Jackson DG, Alves F, Schirner M, Haberey M, Thierauch KH, Wiedenmann B, Rosewicz S: Vascular endothelial growth factor-D induces lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in models of ductal pancreatic cancer. Int J Oncol 2005; 27(3):669-679.
(518) von Rahden BH, Stein HJ, Puhringer F, Koch I, Langer R, Piontek G, Siewert JR, Hofler H, Sarbia M: Coexpression of cyclooxygenases (COX-1, COX-2) and vascular endothelial growth factors (VEGF-A, VEGF-C) in esophageal adenocarcinoma. Cancer Res 2005; 65(12):5038-5044.
(519) Wafai R, Tudor EM, Angus JA, Wright CE: Vascular effects of FGF-2 and VEGF-B in rabbits with bilateral hind limb ischemia. J Vasc Res 2009; 46(1):45-54.
(520) Wang GG, Yao JC, Worah S, White JA, Luna R, Wu TT, Hamilton SR, Rashid A: Comparison of genetic alterations in neuroendocrine tumors: frequent loss of chromosome 18 in ileal carcinoid tumors. Mod Pathol 2005; 18(8):1079-1087.
(521) Wang XL, Ai ZS, Fang JP, Tang RY, Chen XM: [Expression of vascular endothelial growth factors (VEGF)-A, -C and -D and their prognostic significance and relationship with angio- and lymphangiogenesis in gastric cancer]. Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 2008; 30(11):837-843.
(522) Wang Y, Xu HT, Ueda Y, Shimasaki M, Wang EH: Activation ratio of MMP-2 and expression of MT1-MMP are correlated in thymic epithelial tumours. Pathology 2007; 39(5):486-490.
(523) Wang YY, Ye ZY, Zhao ZS, Tao HQ: [Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor, fms-like tyrosine kinase-1 and biological behavior in gastric carcinoma]. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi 2007; 10(3):269-273.
(524) Wasenius VM, Hemmer S, Kettunen E, Knuutila S, Franssila K, Joensuu H: Hepatocyte growth factor receptor, matrix metalloproteinase-11, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and fibronectin are up-

regulated in papillary thyroid carcinoma: a cDNA and tissue microarray study. Clin Cancer Res 2003; 9(1):68-75.
(525) Wei YZ, Li CF, Xue YW: [Expression of transcription factor SP1, vascular endothelial growth factor and CD34 in serosa-infiltrating gastric cancer and their relationship with biological behavior and prognosis]. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi 2009; 12(2):145-149.
(526) Weidner N: Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. Am J Pathol 1995; 147(1):9-19.
(527) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med 1991; 324(1):1-8.
(528) Weigand M, Hantel P, Kreienberg R, Waltenberger J: Autocrine vascular endothelial growth factor signalling in breast cancer. Evidence from cell lines and primary breast cancer cultures in vitro. Angiogenesis 2005; 8(3):197-204.
(529) Westermarck J, Kahari VM: Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. FASEB J 1999; 13(8):781-792.
(530) Wey JS, Fan F, Gray MJ, Bauer TW, McCarty MF, Somcio R, Liu W, Evans DB, Wu Y, Hicklin DJ, Ellis LM: Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. Cancer 2005; 104(2):427-438.
(531) White JD, Hewett PW, Kosuge D, McCulloch T, Enholm BC, Carmichael J, Murray JC: Vascular endothelial growth factor-D expression is an independent prognostic marker for survival in colorectal carcinoma. Cancer Res 2002; 62(6):1669-1675.
(532) Wiedenmann B, John M, hnert-Hilger G, Riecken EO: Molecular and cell biological aspects of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. J Mol Med 1998; 76(9):637-647.
(533) Wild A, Ramaswamy A, Langer P, Celik I, Fendrich V, Chaloupka B, Simon B, Bartsch DK: Frequent methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene in pancreatic endocrine tumors. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88(3):1367-1373.
(534) Williams CS, Leek RD, Robson AM, Banerji S, Prevo R, Harris AL, Jackson DG: Absence of lymphangiogenesis and intratumoural lymph vessels in human metastatic breast cancer. J Pathol 2003; 200(2):195-206.
(535) Wolf C, Chenard MP, Durand de GP, Bellocq JP, Chambon P, Basset P: Breast-cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed in basal cell carcinoma and during cutaneous wound healing. J Invest Dermatol 1992; 99(6):870-872.
(536) Wong SY, Haack H, Crowley D, Barry M, Bronson RT, Hynes RO: Tumor-secreted vascular endothelial growth factor-C is necessary for prostate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis. Cancer Res 2005; 65(21):9789-9798.
(537) Wood M, Fudge K, Mohler JL, Frost AR, Garcia F, Wang M, Stearns ME: In situ hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 expression in human prostate cancer. Clin Exp Metastasis 1997; 15(3):246-258.
(538) Wright CE: Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF)A and VEGFB gene transfer on vascular reserve in a conscious rabbit hindlimb ischaemia model. Clin Exp Pharmacol Physiol 2002; 29(11):1035-1039.
(539) Wright NA: The origin of gut neuroendocrine cells; in: Modlin IM, Oberg K, (eds): A Century of advances in neuroendocrine tumor biology and treatment. Felsenstein C.C.C.P., 2007, pp 156-163.
(540) Wu H, Li Y, Zhu G, Zhang L, Zhang X, He X: [Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor (Flt-1) in breast carcinoma]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 2002; 82(10):708-711.
(541) Wu Y, Zhu Z: Vascular endothelial growth factor receptor 1, a therapeutic target in cancer, inflammation and other disorders. Curr Med Chem 2009; 16(22):2890-2898.
(542) Wu ZY, Li JH, Zhan WH, He YL: Lymph node micrometastasis and its correlation with MMP-2 expression in gastric carcinoma. World J Gastroenterol 2006; 12(18):2941-2944.
(543) Yamamoto H, Itoh F, Iku S, Adachi Y, Fukushima H, Sasaki S, Mukaiya M, Hirata K, Imai K: Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human pancreatic adenocarcinomas: clinicopathologic and prognostic significance of matrilysin expression. J Clin Oncol 2001; 19(4):1118-1127.
(544) Yamashita K, Tanaka Y, Mimori K, Inoue H, Mori M: Differential expression of MMP and uPA systems and prognostic relevance of their expression in esophageal squamous cell carcinoma. Int J Cancer 2004; 110(2):201-207.
(545) Yanagawa T, Funasaka T, Tsutsumi S, Watanabe H, Raz A: Novel roles of the autocrine motility factor/phosphoglucose isomerase in tumor malignancy. Endocr Relat Cancer 2004; 11(4):749-759.
(546) Yang AD, Camp ER, Fan F, Shen L, Gray MJ, Liu W, Somcio R, Bauer TW, Wu Y, Hicklin DJ, Ellis LM: Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. Cancer Res 2006; 66(1):46-51.
(547) Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, Abdalla EK, Fleming JB, Vauthey JN, Rashid A, Evans DB: One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. J Clin Oncol 2008; 26(18):3063-3072.
(548) Yao JC, Lombard-Bohas C, Baudin E, Kvols LK, Rougier P, Ruszniewski P, Hoosen S, St PJ, Haas T, Lebwohl D, Van CE, Kulke MH, Hobday TJ, O'Dorisio TM, Shah MH, Cadiot G, Luppi G, Posey JA, Wiedenmann B: Daily oral everolimus activity in patients with metastatic pancreatic neuroendocrine tumors after failure of cytotoxic chemotherapy: a phase II trial. J Clin Oncol 2010; 28(1):69-76.
(549) Yao JC, Phan A, Hoff PM, Chen HX, Charnsangavej C, Yeung SC, Hess K, Ng C, Abbruzzese JL, Ajani JA: Targeting vascular endothelial growth factor in advanced carcinoid tumor: a random assignment

phase II study of depot octreotide with bevacizumab and pegylated interferon alpha-2b. J Clin Oncol 2008; 26(8):1316-1323.

(550) Yao JC, Phan AT, Chang DZ, Wolff RA, Hess K, Gupta S, Jacobs C, Mares JE, Landgraf AN, Rashid A, Meric-Bernstam F: Efficacy of RAD001 (everolimus) and octreotide LAR in advanced low- to intermediate-grade neuroendocrine tumors: results of a phase II study. J Clin Oncol 2008; 26(26):4311-4318.

(551) Yao JC, Xie K: Development of novel therapeutic agents for neuroendocrine tumors; in: Modlin IM, Oberg K, (eds): A Century of advances in neuroendocrine tumor biology and treatment. Hannover, Germany, Felsenstein C.C.C.P., 2007, pp 370-377.

(552) Yonekura H, Sakurai S, Liu X, Migita H, Wang H, Yamagishi S, Nomura M, Abedin MJ, Unoki H, Yamamoto Y, Yamamoto H: Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. J Biol Chem 1999; 274(49):35172-35178.

(553) Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, Fushida S, Ninomiya I, Bandou E, Taniguchi K, Miwa K, Ohoyama S, Sugiyama K, Sasaki T: Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in gastric cancer. Clin Cancer Res 1999; 5(7):1823-1829.

(554) Yonemura Y, Endo Y, Tabata K, Kawamura T, Yun HY, Bandou E, Sasaki T, Miura M: Role of VEGF-C and VEGF-D in lymphangiogenesis in gastric cancer. Int J Clin Oncol 2005; 10(5):318-327.

(555) Yonenaga Y, Mori A, Onodera H, Yasuda S, Oe H, Fujimoto A, Tachibana T, Imamura M: Absence of smooth muscle actin-positive pericyte coverage of tumor vessels correlates with hematogenous metastasis and prognosis of colorectal cancer patients. Oncology 2005; 69(2):159-166.

(556) Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS: Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. J Biochem Mol Biol 2003; 36(1):128-137.

(557) Yoshiji H, Harris SR, Raso E, Gomez DE, Lindsay CK, Shibuya M, Sinha CC, Thorgeirsson UP: Mammary carcinoma cells over-expressing tissue inhibitor of metalloproteinases-1 show enhanced vascular endothelial growth factor expression. Int J Cancer 1998; 75(1):81-87.

(558) Yoshikawa T, Tsuburaya A, Kobayashi O, Sairenji M, Motohashi H, Yanoma S, Noguchi Y: Intratumoral concentrations of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in patients with gastric carcinoma a new biomartker for invasion and its impact on survival. Cancer 2001; 91(9):1739-1744.

(559) Yu JX, Zhang XT, Liao YQ, Zhang QY, Chen H, Lin M, Kumar S: Relationship between expression of CD105 and growth factors in malignant tumors of gastrointestinal tract and its significance. World J Gastroenterol 2003; 9(12):2866-2869.

(560) Yuanming L, Feng G, Lei T, Ying W: Quantitative analysis of lymphangiogenic markers in human gastroenteric tumor. Arch Med Res 2007; 38(1):106-112.

(561) Zeng Z, Sun Y, Shu W, Guillem JG: Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 is a basement membrane-associated protein that is significantly decreased in human colorectal cancer. Dis Colon Rectum 2001; 44(9):1290-1296.

(562) Zeng ZS, Cohen AM, Zhang ZF, Stetler-Stevenson W, Guillem JG: Elevated tissue inhibitor of metalloproteinase 1 RNA in colorectal cancer stroma correlates with lymph node and distant metastases. Clin Cancer Res 1995; 1(8):899-906.

(563) Zetter BR: Angiogenesis and tumor metastasis. Annu Rev Med 1998; 49:407-424.

(564) Zhan P, Wang J, Lv XJ, Wang Q, Qiu LX, Lin XQ, Yu LK, Song Y: Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in patients with lung cancer: a systematic review with meta-analysis. J Thorac Oncol 2009; 4(9):1094-1103.

(565) Zhang B, Cao X, Liu Y, Cao W, Zhang F, Zhang S, Li H, Ning L, Fu L, Niu Y, Niu R, Sun B, Hao X: Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. BMC Cancer 2008; 8:83.

(566) Zhang B, Zhao WH, Zhou WY, Yu WS, Yu JM, Li S: Expression of vascular endothelial growth factors-C and -D correlate with evidence of lymphangiogenesis and angiogenesis in pancreatic adenocarcinoma. Cancer Detect Prev 2007; 31(6):436-442.

(567) Zhang F, Tang Z, Hou X, Lennartsson J, Li Y, Koch AW, Scotney P, Lee C, Arjunan P, Dong L, Kumar A, Rissanen TT, Wang B, Nagai N, Fons P, Fariss R, Zhang Y, Wawrousek E, Tansey G, Raber J, Fong GH, Ding H, Greenberg DA, Becker KG, Herbert JM, Nash A, Yla-Herttuala S, Cao Y, Watts RJ, Li X: VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106(15):6152-6157.

(568) Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. World J Gastroenterol 2002; 8(6):994-998.

(569) Zhang HZ, Wei YP, Li HG, Wang M, Liu JG, Wu C: [Expressions of vascular endothelial growth factor C and matrix metalloproteinases-2 and prognosis of non-small cell lung carcinoma]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 2006; 26(9):1307-1310.

(570) Zhang J, Jia Z, Li Q, Wang L, Rashid A, Zhu Z, Evans DB, Vauthey JN, Xie K, Yao JC: Elevated expression of vascular endothelial growth factor correlates with increased angiogenesis and decreased progression-free survival among patients with low-grade neuroendocrine tumors. Cancer 2007; 109(8):1478-1486.

(571) Zhang L, Zhao ZS, Ru GQ, Ma J: Correlative studies on uPA mRNA and uPAR mRNA expression with vascular endothelial growth factor, microvessel density, progression and survival time of patients with gastric cancer. World J Gastroenterol 2006; 12(25):3970-3976.

(572) Zhang S, Li L, Lin JY, Lin H: Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma. World J Gastroenterol 2003; 9(5):899-904.
(573) Zhang YG, DU J, Tian XX, Zhong YF, Fang WG: Expression of E-cadherin, beta-catenin, cathepsin D, gelatinases and their inhibitors in invasive ductal breast carcinomas. Chin Med J (Engl) 2007; 120(18):1597-1605.
(574) Zheng H, Takahashi H, Murai Y, Cui Z, Nomoto K, Niwa H, Tsuneyama K, Takano Y: Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma. Anticancer Res 2006; 26(5A):3579-3583.
(575) Zhou YJ, Xiong YX, Wu XT, Shi D, Fan W, Zhou T, Li YC, Huang X: Inactivation of PTEN is associated with increased angiogenesis and VEGF overexpression in gastric cancer. World J Gastroenterol 2004; 10(21):3225-3229.
(576) Zucker S, Cao J, Chen WT: Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. Oncogene 2000; 19(56):6642-6650.
(577) Zucker S, Vacirca J: Role of matrix metalloproteinases (MMPs) in colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev 2004; 23(1-2):101-117.
(578) Zuetenhorst JM, Taal BG: Metastatic carcinoid tumors: a clinical review. Oncologist 2005; 10(2):123-131.
(579) Zynger DL, Dimov ND, Ho LC, Laskin WB, Yeldandi AV: Differential expression of neural-cadherin in pulmonary epithelial tumours. Histopathology 2008; 52(3):348-354.

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Prinz möchte ich ganz besonders für die stets freundliche Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen danken. Seine kompetente Führung, verlässliche Betreuung und Stringenz waren entscheidend für die Initiierung und Realisierung dieser Arbeit und der damit verbundenen Publikationen.

Frau Dr. Petra Voland bin ich zutiefst dankbar. Sie stand mir als Betreuerin jahrelang geduldig mit konkreter, fachkundiger und präziser Hilfe zur Seite. Dabei ging ihr selbstloses Engagement weit über jede Pflichterfüllung hinaus. Sie war das Fundament unserer Arbeitsgruppe.

Herr Prof. Dr. Aurel Perren hat ebenfalls dankenswerter Weise mit wegweisender Fachkompetenz, praktischen Beistand und großer Freundlichkeit wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Frau Maria Bögl, Frau Dr. Dorothee M. Baur, Herrn Dr. Ruppert Langer und diversen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie möchte ich mich für ihre wichtigen, praktischen Beiträge zu dieser Studie, die sie liebenswürdiger Weise und mit zum Teil großem Zeitaufwand geleistet haben, bedanken. Den Doktores Mathias Friedrich, Thomas Braun, Susanne Schwendy, Anar Dossumbekova und Roland Rad verdanke ich maßgeblich Kenntnisse über verschiedene wissenschaftliche Methoden, die sie mir jeweils sehr großzügig und geduldig vermittelt haben.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, wie auch der AG PD Dr. Gerhard und sämtlichen assoziierten Wissenschaftlern möchte ich ganz herzlich für die außerordentlich freundliche Atmosphäre und große Hilfsbereitschaft, die den Laboralltag prägten, danken. Ohne sie wäre ich nie so weit gekommen und ich schätze jeden einzelnen von ihnen.

Meine Familie und meine Freunde haben mir mit ihrer treuen Zuneigung, Geduld und ihren individuellen Besonderheiten über so manches Tief hinweggeholfen. Ihnen allen schulde ich großen Dank.

Meine bemerkenswerten Großeltern setzten den soliden Grundstein und intellektuellen Maßstab für uns, dafür bewundere und achte ich sie. Auch meinen Eltern gegenüber möchte ich meine tiefe Liebe und meinen Respekt zum Ausdruck bringen. Sie haben von Beginn an meinen Horizont erweitert, mir eine tolerante Weltsicht vermittelt und eine umfassende Ausbildung ohne finanzielle Sorgen ermöglicht. Besonders meiner Mutter möchte ich für ihre bedingungslosen Liebe und Unterstützung danken.