

Aus der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie

Geschäftsführender Direktor Prof. Dr. D. Bartsch

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg

**Die klinische Bedeutung der Expression von Pancreatic-duodenal homeobox 1 (Pdx1)
und Sonic Hedgehog (Shh) in Gastrinomen des Pankreas und des Duodenums**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin



Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von Ricarda Ramerth (geb. Berti) aus Iserlohn

Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 21.02.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Rothmund

Referent: PD Dr. med. Volker Fendrich

Korreferent: PD Dr. med. Patrick Michl

Meiner Familie

I. EINLEITUNG.....	1
I.1 DAS ZOLLINGER-ELLISON-SYNDROM (ZES).....	1
I.1.1 Geschichtlicher Hintergrund.....	1
I.1.2 Pathophysiologie.....	1
I.1.3 Epidemiologie und Prognose.....	2
I.1.4 Unterschiede zwischen duodenalen und pankreatischen Gastrinomen.....	5
I.1.5 Makroskopie und Mikroskopie.....	6
I.1.6 Klinik.....	7
I.1.7 Diagnostik bei Gastrinomen.....	9
I.1.7.1 Laborchemische Diagnostik.....	9
I.1.7.2 Bildgebende Lokalisationsdiagnostik.....	12
I.1.8 Therapie.....	15
I.1.8.1 Medikamentöse Therapie.....	15
I.1.8.1.1 Biotherapie.....	15
I.1.8.1.2. Chemotherapie.....	16
I.1.8.2 Operative Therapie.....	16
I.1.8.2.1 Indikationsstellung.....	16
I.1.8.2.2 Operative Strategie.....	18
I.1.8.2.2.1 E nukleation.....	19
I.1.8.2.2.2 Pankreaslinksresektion.....	20
I.1.8.2.2.3 Pylorus erhaltende partielle Duodenopankreatektomie (PPPD).....	21
I.2 PANCREATIC AND DUODENAL HOMEBOX GENE 1 (PDX1).....	23
I.2.1 Pdx1 in der Entwicklung des Pankreas.....	24
I.2.1 Pdx1 im adulten Pankreas.....	27
I.3 SONIC HEDGEHOG.....	28
II. ZIELE.....	31
II.1 GIBT ES EINE MOLEKULAREN MARKER, DER ZWISCHEN DUODENALEN UND PANKREATISCHEN GASTRINOMEN UNTERSCHIEDEN KANN?.....	31
II.2 KANN ANHAND DIESES MARKERS BEI UNKLAREM PRIMARIUS RÜCKSCHLUSS AUF DAS URSPRUNGSORGAN GENOMMEN WERDEN?.....	31
II.3 KANN DIESER MARKER HELFEN, DAS GEEIGNETE OPERATIONSVERFAHREN AUSZUWÄHLEN?.....	31
II.4 KANN EINE AUSWERTUNG VON TUMOREN ANHAND DES MARKERS DIE PROGNOSE DES PATIENTEN BEEINFLUSSEN?.....	31
III. MATERIAL UND METHODEN.....	32
III.1 PATIENTENKOLLEKTIV.....	32
III.2.1 HE UND IMMUNHISTOCHEMIE.....	32
III.2.1.1 HE.....	32
III.2.1.2 Immunhistochemie.....	33
III.2.2 AUSWERTUNG.....	35
III.2.3 GERÄTE UND ZUBEHÖR.....	35
III.2.4 GEBRAUCHSWAREN.....	36
III.2.5 CHEMIKALIEN.....	37
III.2.6 PUFFER UND STAMMLÖSUNGEN:.....	38
III.2.6.1 Puffer.....	38
III.2.6.2 Stammlösungen.....	38
III.2.7 ANTIKÖRPER.....	38
III.2.7.1 Primäre Antikörper.....	39
III.2.7.2 Sekundäre Antikörper.....	39
III.2.7.3 Sekundäre Konjugate.....	39
IV. ERGEBNISSE.....	40

IV.1 PDX1	42
IV.1.1 Pdx1 in pankreatischen Gastrinomen und ihren Metastasen	42
IV.1.2 Pdx1 in duodenalen Gastrinomen und ihren Metastasen	43
IV.2 SONIC HEDGEHOG (SHH).....	44
IV.2.1 Sonic Hedgehog in pankreatischen Gastrinomen und deren Metastasen.....	44
IV.2.2 Sonic Hedgehog in duodenalen Gastrinomen und deren Metastasen	44
IV.3 PDX 1 UND SHH IN METASTASEN EINES UNBEKANNTEN PRIMARIUS.....	45
IV.4 FOLLOW-UP	46
V. DISKUSSION	47
VI. ZUSAMMENFASSUNG	53
VI. 1 DEUTSCHE VERSION	53
VI. 2 ENGLISCHE VERSION	54
VII. LITERATURVERZEICHNIS	56
A	56
B	56
C	57
D	58
F.....	58
G	59
H.....	60
I.....	61
J	61
K	62
L.....	63
M	64
N.....	64
O	65
P.....	65
R	66
S.....	66
T.....	67
W	67
Z.....	67
VIII. ANHANG.....	68
VIII.1 ABBILDUNGSVERZICHNIS.....	68
VIII.2 TABELLENVERZEICHNIS	69
VIII.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	69
IX. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....	76
X. DANKSAGUNG	76

I. Einleitung

I.1 Das Zollinger-Ellison-Syndrom (ZES)

I.1.1 Geschichtlicher Hintergrund

1955 stellten die amerikanischen Chirurgen Robert Milton Zollinger (1903–1992) und Edwin Homer Ellison (1918-1970) erstmals auf einer Zusammenkunft von Chirurgen in Philadelphia in ihrer Arbeit „Primary Peptic Ulcerations of the Jejunum Associated with Islet Cell Tumors of the Pancreas“ ein neu entdecktes Syndrom vor, das nach ihnen benannt wurde, das Zollinger-Ellison-Syndrom (ZES) [Zollinger RM, Ellison EH, 1955]. Ihre Beschreibung fußte zu diesem Zeitpunkt auf nur zwei beobachteten Fällen. Dieses Syndrom setzt sich aus einer Symptomtrias aus übermäßiger Magensäuresekretion mit konsekutiven Ulcera in Magen, Duodenum und Ileum bei gleichzeitigem Vorhandensein eines Gastrin-produzierendem Pankreastumors zusammen.

Inzwischen weiß man, dass auch diffuse Oberbauchschmerzen, Protonenpumpeninhibitoren-resistente Ulcera in Magen und Duodenum, wässrige Diarrhoen und hypertrophe Magenkorpusfalten [Arnold et al., 2005] zu der möglichen Klinik eines ZES gehören.

I.1.2 Pathophysiologie

Das ZES wird durch solitäre oder multiple neuroendokrine Tumoren des Pankreas oder des Duodenums hervorgerufen, die das Hormon Gastrin exprimieren und deshalb auch Gastrinome genannt werden. Die Tumore bestehen nahezu vollständig aus Gastrin-produzierenden Zellen und haben die Fähigkeit verloren, das Hormon zu speichern. Deshalb kommt es zu einer unkontrollierten Freisetzung von Gastrin aus den Tumoren, die sich, anders als die G-Zellen der Magenschleimhaut, der natürlichen Feedback-Regulation durch Somatostatin aus den D-Zellen und dem pH-Wert des Magensaftes entziehen. Gastrin verursacht eine Überexpression von Magensäure, indem es auf die Parietalzellen des Magens wirkt, die daraufhin mehr Wasserstoffionen in das Magenlumen freisetzen und so zu einer Hyperchlorhydrie führen. Dieser Säureanstieg führt zur Entwicklung von Ulcera an typischen (Ulcera ventriculi) und untypischen (Ulcera duodeni et jejuni) Lokalisationen. Abgesehen davon ist Gastrin auch für das Wachstum der Magenschleimhaut im Korpusbereich verantwortlich, was die Hypertrophie derselben bei Patienten mit ZES erklärt (s. Abb. 1) [Arnold aus Praxis der Visceralchirurgie, Endokrine Chirurgie, Kapitel 5.1.1].

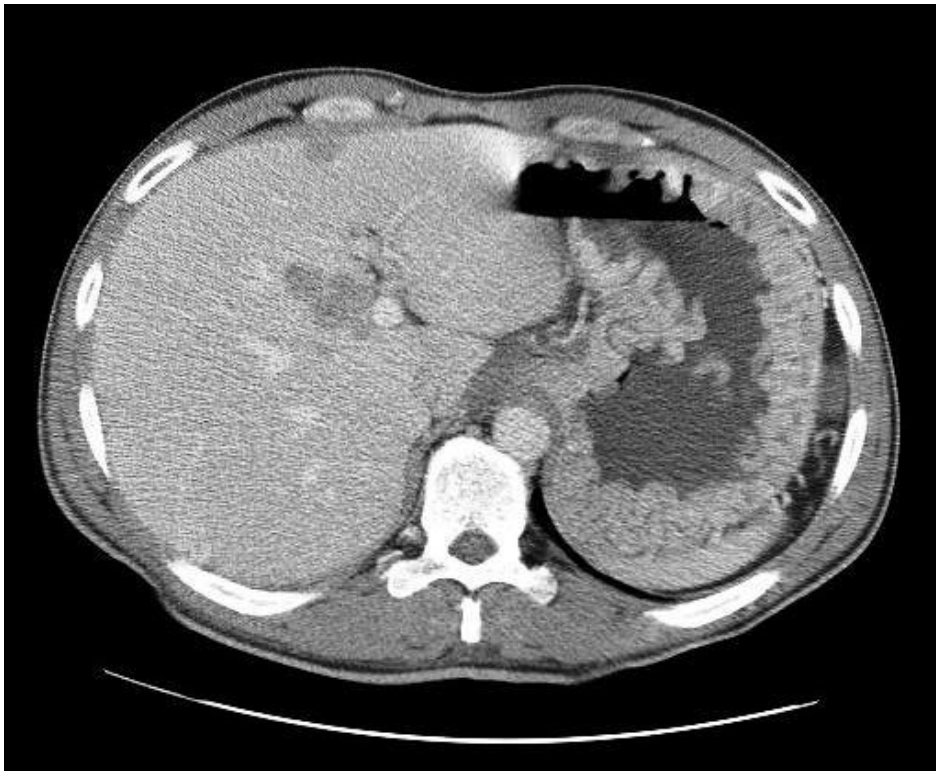


Abbildung 1 Ein CT, das die Magenschleimhauthypertrophie eines Gastrinompatienten zeigt

I.1.3 Epidemiologie und Prognose

Die Inzidenz des ZES liegt bei ca. 1,5:1000000 Einwohner pro Jahr und betrifft etwas häufiger Männer als Frauen [Klöppel, 1996; Jensen RT, 2006]. Meist tritt es zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr auf, bei der Multiplen Endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN 1) einige Jahre früher.

Zwischen 80 und 90% aller Gastrinome sind im so genannten Gastrinom-Dreieck lokalisiert, welches kaudal von der Mündung des Ductus cysticus in den DHC, kranial von der Lymphknotenstation D2/D3 und medial vom Pankreaskopf begrenzt wird und das Duodenum einschließt (s. Abb. 2).

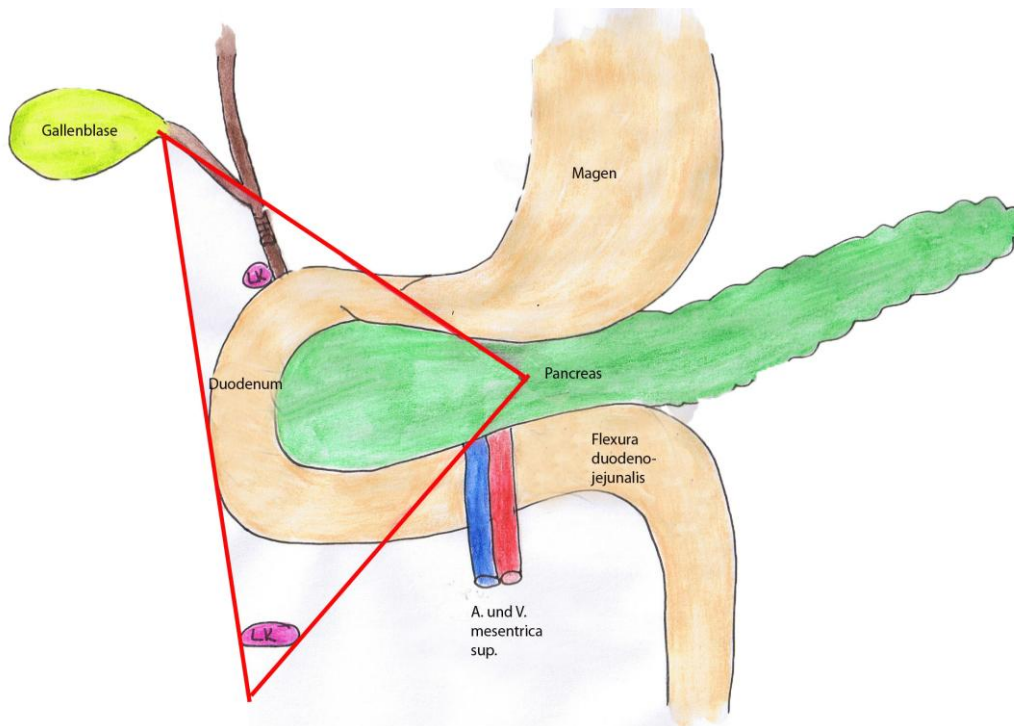


Abbildung 2 Gastrinom-Dreieck (Stabile BE 1984, modifiziert durch Ramerth)

Gastrinome treten sporadisch (70-80%) auf oder in Zusammenhang mit einer autosomal-dominant vererbten Erkrankung, den Multiplen Endokrinen Neoplasien Typ 1 (MEN1, auch Wermer-Syndrom genannt, 20-30%) [Norton et al., 2005].

1954 war es Wermer, der ein erbliches Syndrom erkannte und beschrieb [Werner, 1954]. Er führte den Terminus „Adenomatose der endokrinen Drüsen“ ein und veröffentlichte seine Beobachtungen über eine Familie, in der der Vater und vier von neun Nachkommen betroffen waren. So entstand die Annahme, dass diese Adenomatose auf der autosomal dominanten Vererbung eines einzigen Gens mit sehr hoher Penetranz beruhen müsse. Dieses „Wermer-Syndrom“ wird inzwischen als Multiple endokrine Neoplasie Typ 1 oder MEN1-Syndrom bezeichnet.

Heute weiß man, dass die Ursache des MEN1-Syndrom eine Keimbahnmutation im Menin-Gen (Chromosom 11q13) ist, die bei etwa 85% der Patienten nachgewiesen werden kann [Chandrasekharappa SC et al., 1997]. Bei den betroffenen Patienten findet man Adenome der Epithelkörperchen, neuroendokrine Tumoren des Pankreas sowie des Duodenums und der Hypophyse [Shen HC et al., 2009].

Maligne Gastrinome (30-50%) metastasieren lymphogen und hämatogen, bevorzugt in die Leber. Leberfiliae haben einen besonderen Einfluss auf die Prognose der Erkrankung [Pachera et al., 2009]. Auch deshalb muss zwischen sporadischen Gastrinomen und solchen

im Rahmen eines MEN1 unterschieden werden, bei dem sie häufig multizentrisch auftreten. Sie finden sich häufiger im Duodenum als im Pankreas und metastasieren seltener und später als sporadische. Häufig sind sie so klein, dass sie sich jeder bildgebenden Diagnostik entziehen. 95% der Metastasen treten innerhalb des ersten Jahres nach Diagnosestellung auf. Die 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) beträgt für die nur in Lymphknoten metastasierten Gastrinome 90%, für solche mit Lebermetastasen 30%. Der Grad der Metastasierung sowie die Mortalität nehmen mit der Größe des Primärtumors zu [Fendrich, 2007; Jeung Hye Han et al., 2009]. Tumore mit einer Größe von über 2 cm sollten als malignitätsverdächtig eingestuft und entsprechend therapiert werden [Norton, 2005].

Dazu gibt auch die nachfolgende Tabelle Aufschluss

Tabelle 1 Klassifikation der neuroendokrinen Tumoren des Pankreas (Klöppel 2003)

Malignitäts-grad	Tumorart	Differen-zierung	Organ	Größe	Proliferations-marker
benigne	Insulinom NFPT	hoch	beschränkt auf Pankreas, nicht angio-invasiv	<2cm	≤2 Mitosen/HPF ≤2% Ki-67-positive Zellen
benigne oder niedrig maligne	funktionelle NPT und NFPT	hoch	beschränkt auf Pankreas, angio-invasiv	≥2 cm	>2 Mitosen/HPF, >2% Ki-67-positive Zellen
niedrig maligne	funktionelle NPT und NFPT	hoch	Invasion angrenzender Organe und/oder Metastasen	≥2 cm	>2 Mitosen/HPF, >2% Ki-67-positive Zellen
hoch maligne	funktionelle NPT und NFPT	niedrig	Invasion angrenzender Organe und/oder Metastasen	≥2 cm	>2 Mitosen/HPF, >2% Ki-67-positive Zellen

NPT: neuroendokriner Pankreastumor; NFPT: nicht-funktioneller neuroendokriner Pankreastumor; HPF: High power field

Neuroendokrine Tumore im Allgemeinen werden seit 2000 nach der WHO- Klassifikation außerdem nach Histologie und Dignität in drei Hauptklassen eingeteilt:

Tabelle 2 WHO-Klassifikation neuroendokriner Tumore

I	Gut differenzierte neuroendokrine Tumore	eher benigne
II	Gut differenzierte neuroendokrine Karzinome	niedrig maligne
III	Schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome	hoch maligne

I.1.4 Unterschiede zwischen duodenalen und pankreatischen Gastrinomen

Entgegen der früheren Annahme, dass etwa 80% aller Gastrinome im Pankreas und nur 20% im Duodenum liegen, konnte von Sugg et al. [Sugg, 1993] gezeigt werden, dass 50 - 70% aller Gastrinome in der Duodenalwand liegen. Die Malignitätsrate beider Lokalisationen ist in etwa identisch, denn in beiden Fällen bilden 40-70% Filiae. Duodenale Gastrinome sind jedoch kleiner und metastasieren weniger wahrscheinlich in die Leber. Damit haben sie eine bessere Prognose als pankreatische Gastrinome [Norton et al., 2004]. Pankreatische Gastrinome messen meist 1–3 cm im Durchmesser, dagegen sind Duodenalwandgastrinome gewöhnlich kleiner als 1 cm und bevorzugen das proximale Duodenum (s.a. Abb. 3) [Capella et al., 1991]. Bis heute ist es trotz aller modernen bildgebenden Verfahren präoperativ schwierig, Duodenalwandgastrinome aufgrund ihrer geringen Größe darzustellen [Zogakis, 2003]. Meist werden erst ihre Lymphknotenmetastasen apparent und dann verläuft die Suche nach dem Primärtumor in einigen Fällen immer noch erfolglos [Fendrich, 2007].

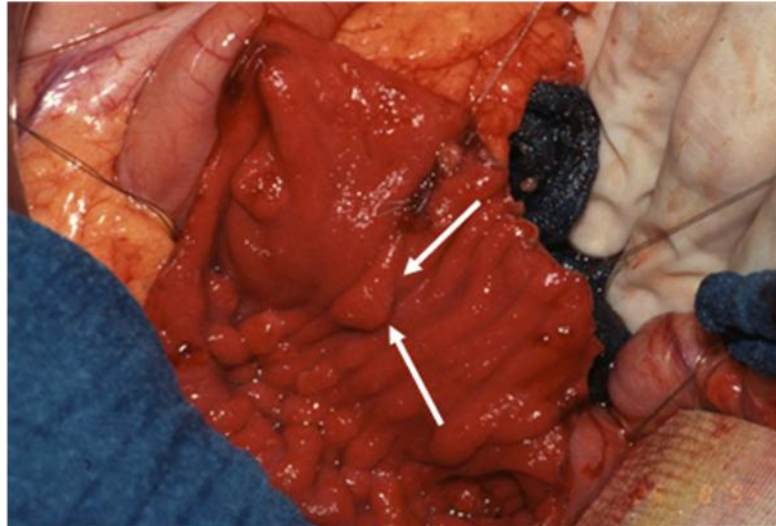


Abbildung 3 Kleines duodenales Gastrinom

Selbst der Goldstandard der präoperativen Lokalisationsdiagnostik, die Endosonographie, mit der vom erfahrenen Untersucher selbst kleine pankreatische Gastrinome detektiert werden können, scheitert bei der Lokalisation der Tumore im Duodenum. Da von der präoperativen Lokalisation jedoch auch die Art der operativen Herangehensweise abhängt, fehlt immer noch ein Marker, der zuverlässig zwischen beiden Tumorentitäten unterscheiden kann.

I.1.5 Makroskopie und Mikroskopie

Laut Donow et al. [Donow, 1991] sind sporadische Gastrinome des Pankreas in der Regel 2-4 cm groß und meist gut begrenzt. Die Schnittfläche kann grau-gelblich erscheinen (s. Abb. 4) [Remmele, 1996]. Mikroskopisch zeigt sich ein solides bzw. trabekulär-pseudoglanduläres Muster und in beinahe 100 % lässt sich immunhistochemisch Gastrin nachweisen, ebenso wie Chromogranin A als allgemeiner neuroendokriner Tumormarker. Zytologisch zeigt das typische Bild für einen neuroendokrinen Tumor eine hohe Zelldifferenzierung mit isomorphen runden Kernen und zarten Nukleolen (s. Abb. 5) [Anlauf M, 2005].

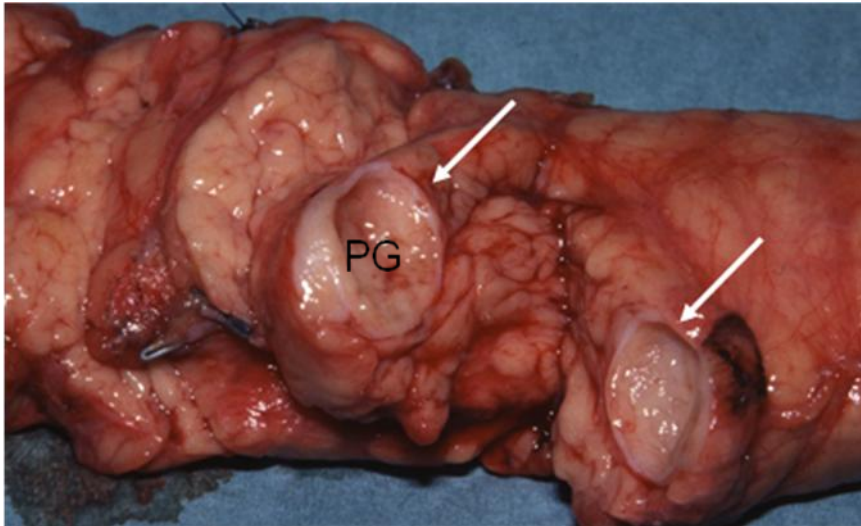


Abbildung 4 Typische Morphologie eines Gastrinoms im fleischfarbenen Pankreasparenchym

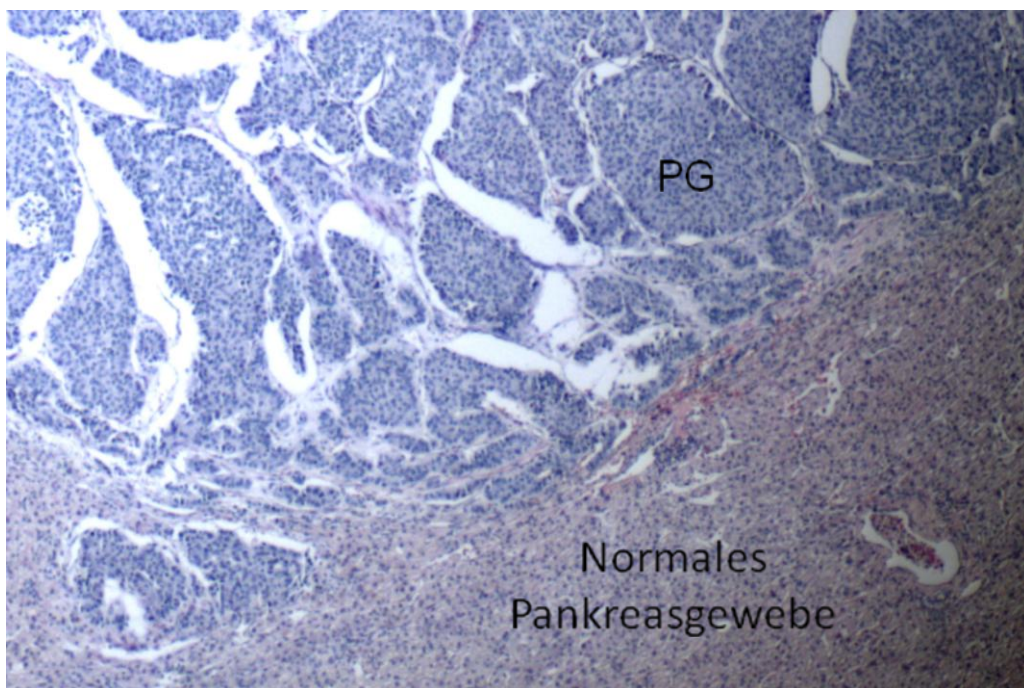


Abbildung 5 Deutlich zu erkennen ist der gut differenzierte neuroendokrine Tumor im Pankreas, der gut abgrenzbar ist.

I.1.6 Klinik

Erstmanifestation sind in 90-95% rezidivierende Ulcera, die zum größten Teil im Duodenum, seltener im Magen und Jejunum, lokalisiert sind und gegen eine Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren resistent sind [Klöppel, PdVC, Kap 5]. Die Patienten äußern

Oberbauchbeschwerden und berichten über voluminöse, wässrige Diarrhöen als Folge der Volumenbelastung des Darms durch die exzessiv gebildete Säure, vor allem morgens und nach Nahrungskarenz. Durch die Schädigung der Duodenalschleimhaut kann es im Verlauf auch zu Steatorrhoe kommen. Außerdem finden sich ausgeprägte Magenkorpufalten und Reflux. Eine Übersicht über die Klinik gibt auch Abb. 6.

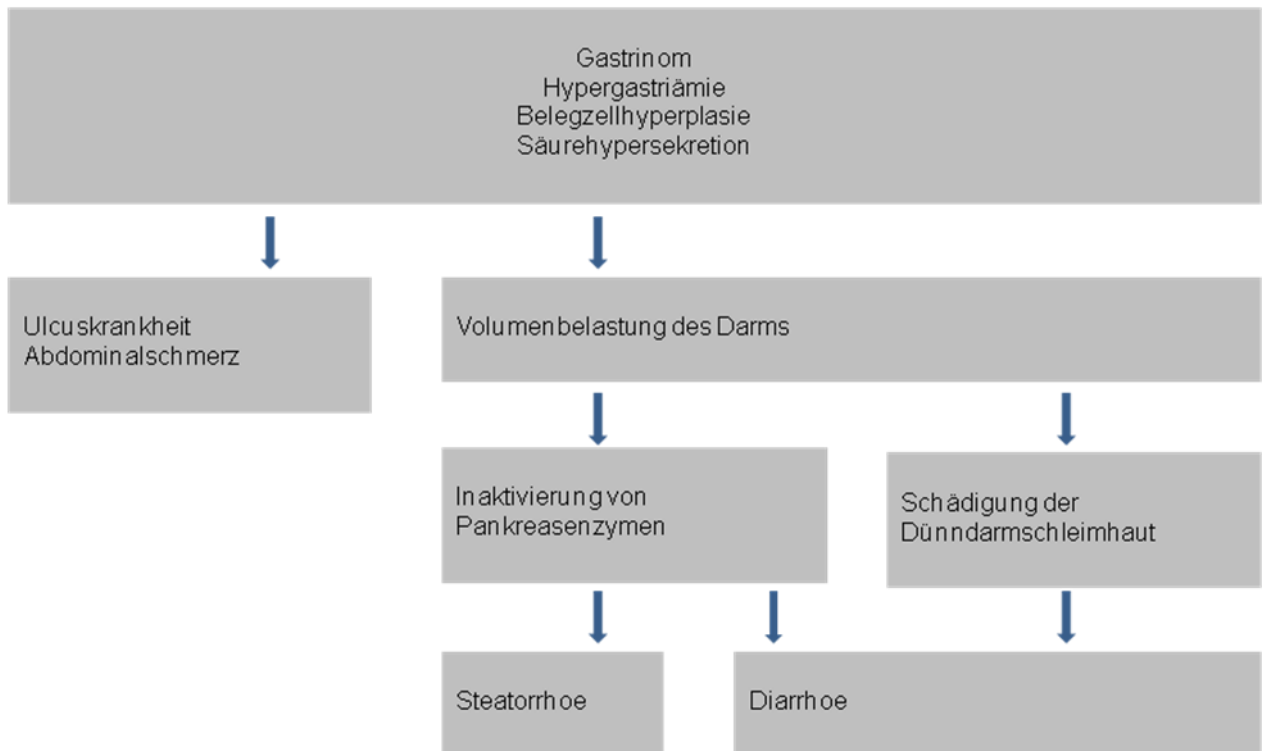


Abbildung 6 Klinik des ZES

Liegt dem ZES eine MEN1-Mutation zugrunde, können noch weitere Symptome hinzu kommen. Dazu gehört eine 4-Drüsen-Epithelkörperchenhyperplasie mit primärem Hyperparathyreoidismus mit erhöhtem Serumkalzium und ein Adenom der Hypophyse, das meist Prolaktin produziert [Arnold et al., PdVC, EC, Kap. 5; Jensen und Gardner 1993]. Außerdem kommen im Rahmen dieser Erkrankung noch weitere endokrine Pankreastumoren wie Insulinome, Glukagonome, VIPome und nicht-funktionelle Tumore vor. Die folgende Tabelle bietet eine Übersicht.

Tabelle 3 Übersicht der Neuroendokrinen Tumoren des Pankreas

Tumor/ Syndrom	Hormon/ Peptid	Symptome	Inzidenz (pro 100.000)	Lokalisation (in %)	Malignität (in %)
Insulinom	Insulin	Hypoglykämie	1-2	99 Pankreas	5 – 15
Gastrinom Zollinger-Ellison- Syndrom	Gastrin	Diarrhoe peptische Ulzera Schmerzen	0,5-1,5	70 Duodenum 25 Pankreas 5 Andere	≥60
VIPom (Verner-Morrison- Syndrom)	VIP	Diarrhoe Hypokaliämie Achlorhydrie	0,05-0,2	90 Pankreas 10 Andere	40-70
Glukagonom	Glukagon	Anämie Erythem Gewichtsverlust Thrombophilie Diabetes Depression	0,01-0,1	99 Pankreas	50-80
Nicht-funktionelle Tumoren	Keine (PP, CgA, NSE)	Gewichtsverlust Hepatomegalie Keine Symptome	1-2	100 Pankreas	60

VIP: Vasoaktives intestinales Peptid, PP: Pankreatisches Polypeptid, CgA: Chromogranin A, NSE: Neuronen Spezifische Enolase

Modifiziert nach Jensen et al., 1999; Metz et al., 2008

I.1.7 Diagnostik bei Gastrinomen

I.1.7.1 Laborchemische Diagnostik

Bei vielen Patienten mit ZES werden initial Fehldiagnosen wie die idiopathische Ulcuskrankheit oder die idiopathische Refluxkrankheit gestellt. Deshalb ist es wichtig, bei Patienten mit PPI-resistenten Ulcera auch an ZES zu denken und entsprechende Diagnostik einzuleiten. Ein Serumgastrinspiegel beim nüchternen Patienten von über 125pg/ml (normal 60-100 pg/ml) und ein pathologischer Sekretin-Test mit einem Wert von über 200pg/ml, bei dem die Stimulierbarkeit von Gastrin bestimmt wird, sind die Voraussetzung zum Stellen der Diagnose eines Zollinger-Ellison-Syndroms [Jensen, 1996; Langer et al., PdVC, EC, Kap. 6].

Dieser beginnt mit der Abnahme zweier Blutproben (Nativblut) beim nüchternen Patienten zur Gastrinbestimmung. Danach erfolgt die Injektion des Sekretins (2IE/kg Körpergewicht) und weitere Blutabnahmen zu den Zeitpunkten 2, 5, 10, 15 und 30 Minuten. Der Test ist dann positiv, wenn das Gastrin innerhalb von zehn Minuten nach i.v.-Injektion von Sekretin um mindestens 100% ansteigt. Dies unterscheidet Gastrinom-Patienten von solchen Patienten mit Hypergastrinämie bei Helikobacter assoziierter Ulcuskrankheit und G-Zell-Hyperplasie, bei denen der Anstieg geringer ausfällt [Arnold et al., PdVC, Kap. 5].

Zusätzlich sollte zumindest eine pH-Metrie des Magensaftes, ggf. mit Bestimmung der Basalsekretion durchgeführt werden. Der Basic Acid Output (BAO) liegt bei Gastrinopatienten über 15mmol HCl/h und ein Magen-pH < 2,5 bei einer Hypergastrinämie ist dringend verdächtig auf einen Gastrin produzierenden Tumor. Die Kombination einer Nüchtern-Hypergastrinämie >1000pg/ml (475pmol/l) mit einem intragastralen pH < 2 oder einem hohen BAO ist beweisend für ein Gastrinom [Aoyagi T, 1966]. Ebenfalls eine sehr hohe Sensitivität für die Diagnose hat die Bestimmung des Verhältnisses der basalen (BAO) zur maximal stimulierten (Maximal Acid Output, MAO) Säuresekretion des Magens. Ein Verhältnis von BAO / MAO von > 0,6 ist hochgradig spezifisch für ein Gastrinom [Banasch M, Schmitz F, 2007]. Eine bestehende Therapie mit einem Protonenpumpenhemmer kann sowohl die Magensaftanalyse als auch die Bestimmung des Magensaft-pH verfälschen. Der Protonenpumpenhemmer muss daher zuvor für wenigstens 48 Stunden abgesetzt werden [Goldman JA et al., 2009].

Zu einer Hypergastrinämie können neben dem ZES auch andere Erkrankungen führen. Zu nennen sind hier 2 Gruppen. Bei der primären Hypergastrinämie kommt es zu einer überhöhten Säuresekretion wie bei einer antralen G-Zell-Hyperplasie im Rahmen einer Helicobacter-pylori-Infektion, einer Magenausgangsstenose, einer chronische Niereninsuffizienz, einem Kurzdarmsyndrom und in seltenen Fällen einem am Duodenalstumpf belassener Antrumrest nach einer BillrothII-Operation. Die sekundäre Hypergastrinämie ist Folge einer verminderten oder aufgehobenen Magensäureproduktion wie bei einer Typ-A-Gastritis oder nach Vagotomie. Auch die Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren führt, wie bereits erwähnt, zu unterschiedlich ausgeprägter Hypergastrinämie.

Ausgeschlossen werden können diese Differentialdiagnosen mittels oben genanntem Sekretin-Test. Die folgende Abb. 7 zeigt das unterschiedliche Verhalten von Serumgastrin nach

Injektion von 75 KU beim Patienten mit einem Gastrinom und einiger Differentialdiagnosen der Hypergastrinämie.

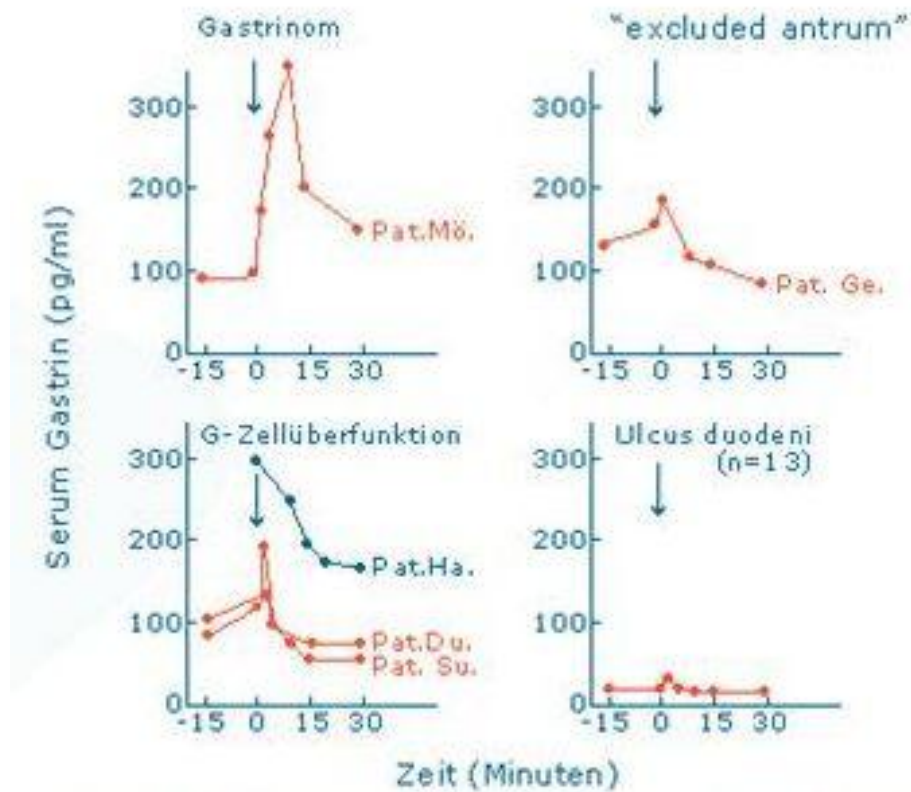


Abbildung 7 Sekretintest [Arnold, PdVC, Kap. 5.4]

Bei einem ZES bei MEN 1 empfiehlt sich bei multiplen Pankreastumoren zur Operationsplanung, deren Entität schlussendlich erst histologisch und immunhistochemisch bewiesen werden kann, eine präoperative Lokalisation mittels SASI-Technik anzuwenden (selektive arterielle Injektion von Sekretin in die Pankreasarterien, kombiniert mit Gastrinmessungen im Lebervenenblut, s. Abb. 8) [Imamura et al., 1987]. Wenn die Gastrinquelle dem Pankreaskopf/ Duodenum zugeordnet werden kann, kann eine pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie (PPPD) in Betracht gezogen werden.

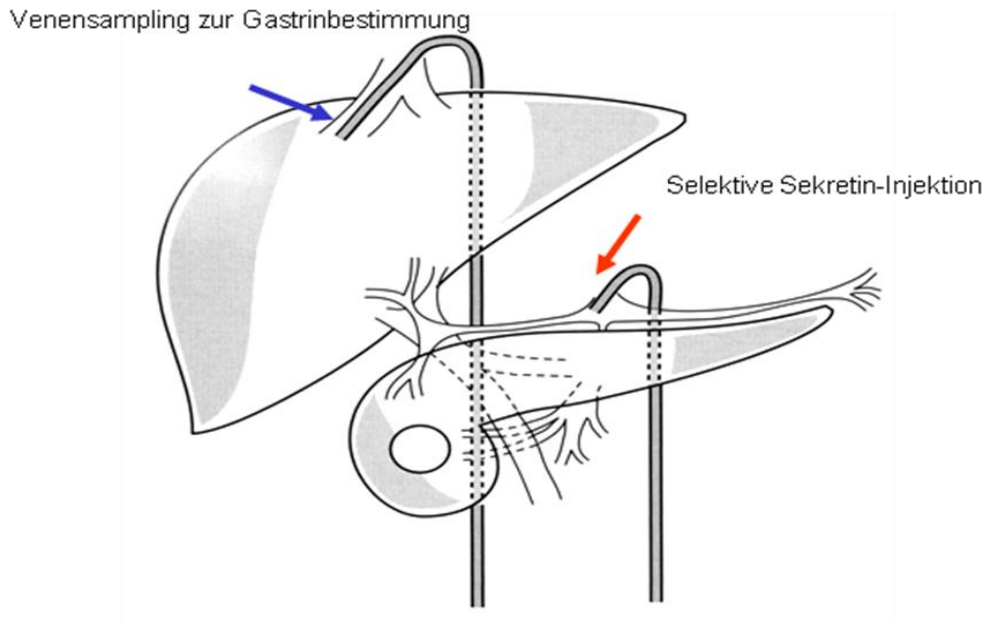


Abbildung 8 SASI

Der sensitivste Methode zum Nachweis eines Rezidivs sind laut Fishbeyn et al. der Sekretin-Test und das Serum-Gastrin [Fishbeyn et al., 1993].

I.1.7.2 Bildgebende Lokalisationsdiagnostik

Als sehr sensitives bildgebendes Verfahren zur Erkennung von pankreatischen Tumoren ist sicher die Endosonographie zu nennen, die, einen erfahrenen Endoskopeur vorausgesetzt, selbst kleinste Raumforderungen erkennen kann [Fendrich, 2007].

Außerdem zu nennen ist die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie (SRS, s. Abb. 9), die es allerdings nicht erlaubt, zwischen Primärtumor und Metastase zu unterscheiden und eher zum Staging und zur Verlaufskontrolle als zur primären Lokalisationsdiagnostik geeignet ist.

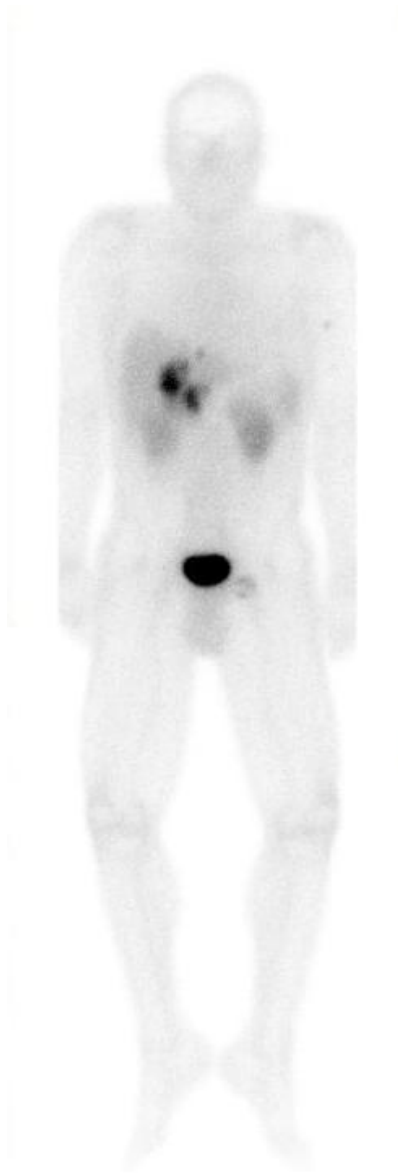


Abbildung 9 Eine SMS-Szintigraphie zeigt Lebermetastasen bei einem Gastrinompatienten

Weitere Bildgebung kann mittels transabdominellem Ultraschall, Angio-CT, Angiographie und MRT erfolgen.

Ein großes Problem ist die präoperative Lokalisationsdiagnostik von duodenalen Gastrinomen, die, wie bereits erwähnt, in der Regel kleiner als 1 cm sind und sich dadurch auch der modernen Bildgebung entziehen. Mit der Computertomographie und der Magnetresonanztomographie ist der Nachweis kleiner Primärtumoren erst ab einer Tumorgöße von 2 cm zuverlässig möglich [Kisker et al., 1996]. Eine Sensitivität von nahezu 100 % zur Lokalisation von sporadischen Gastrinomen besitzen der intraoperative Ultraschall

und die Palpation von Pankreas und Duodenum. Die Duodenotomie und Exploration der Vorder- und Hinterwand sollte bei jeder Operation wegen eines ZES gründlich durchgeführt werden, da dies die Heilungsrate beim sporadischen Gastrinom deutlich verbessert. Dies ist laut Sugg et al. [Sugg et al., 1993] die sensitivste Methode, duodenale Gastrinome zu lokalisieren. Wenn es einen klinischen Marker gäbe, der beweisen könnte, dass ein Primarius im Duodenum zu finden ist, könnte dies die intraoperative Suche deutlich erleichtern.

Die folgende Tabelle bietet eine Übersicht über die angewandte Bildgebung und ihre Sensitivität.

Tabelle 4 Literaturübersicht präoperative Lokalisation von Gastrinomen

Autor (Literatur)	Verfahren	US n (S%)	CT n (S%)	MRT n (S%)	SRS** n (S%)	ES n (S%)	SA n (S%)	SASI*** n (S%)
Kisker et al.		25 (44)	25 (56)	4 (25)	17 (53)	6 (67)	10 (10)	-
Vinik et al.		-	19 (31)	-	-	-	19 (29)	-
Imamura et al.		11 (36)	11 (36)	-	-	-	11 (45)	11 (100)
Norton et al. *		123 (24)	123 (39)	123 (46)	43 (79)	-	123 (48)	92 (86)
Zimmer at al.		15 (27)	15 (27)	15 (27)	15 (87)	15 (79)	-	-
Anderson et al.		-	-	-	-	36 (100)	14 (42)	-
Gibril et al.		24 (46)	24 (42)	24 (71)	24 (92)	-	24 (62)	-
Marburg 1987-2007*		22 (32)	19 (37)	4 (25)	15 (27)	10 (40)	4 (25)	-

(S%)= Sensitivitätsrate; US= Transabdomineller Ultraschall; CT= Computertomographie; MRT= Magnetresonanztomographie; SRS= Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie; ES= Endosonographie; SA= Selektive Angiographie; SASI= Selektive arterielle Sekretin-Injektions-Angiographie; *= nur Patienten mit sporadischen Gastrinomen; **= positive Anreicherung, überwiegend in Metastasen; ***= keine Lokalisation, nur Regionalisierung; #= nur Lebermetasen

I.1.8 Therapie

I.1.8.1 Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie beim ZES ist für die präoperative Phase und bei nicht resektablen oder metastasierten Tumorleiden relevant. Protonenpumpeninhibitoren können helfen, die typische Klinik mit Oberbauchschmerzen und Ulzera sowie akuten Blutungskomplikationen zu reduzieren. Sie binden an die Protonenpumpen der Parietalzellen des Magens und hemmen so irreversibel die Säureproduktion. Beim ZES ist eine Dosierung von bis zu 240 mg Omeprazol am Tag (normal sind 20-40 mg/ Tag) keine Seltenheit [C. Prinz, PdVC, GE, Kap. 27.1]. Somatostatinanaloga vom Typ des Octreotids senken den Serumgastrinspiegel und führen so zur Hemmung der Säureproduktion. Die folgende Tabelle fasst die gängigen medikamentösen Therapieoptionen bei NET zusammen:

I.1.8.1.1 Biotherapie

Tabelle 5 Medikamentöse Therapie der NETs: Biotherapie

Substanz	Wirkung
Somatostatin Analoga (Octreotide/ Lanreotide)	Apoptoseinduktion Aktivierung von Phosphatasen Antiangiogenese Inhibition von Wachstumsfaktoren Hemmung des Insulin-like growth factor 1 Immunmodulation
Interferon (Interferon alpha)	Antiproliferativ Inhibition von Protein und Hormonsynthese Stimulation des Immunsystems
Peptid-Rezeptor-Radionukleotid-Therapie (¹¹¹ In, ⁹⁰ Y, ¹⁷⁷ Lu)	Antiproliferativ

I.1.8.1.2. Chemotherapie

Tabelle 6 Medikamentöse Therapie der PETs: Chemotherapie

Substanz	Wirkung
Pyrimidin Analoga (5- Fluoruracil)	Zytostatisch (Antimetabolit)
Anthracycline (Doxorubicin)	Zytotoxisch (Interkalator)
Nitroseharnstoff (Streptozocin)	Zytostatisch

(modifiziert nach Metz et al., 2008)

I.1.8.2 Operative Therapie

I.1.8.2.1 Indikationsstellung

Die definitive Therapie des ZES ist eine operative [Fendrich, 2009; Kianmanesh 2005]. Inzwischen ist sich die Fachwelt bezüglich der Indikation zur Operation beim sporadischen Gastrinom einig, die die einzige Möglichkeit zur Heilung bietet, so dass jeder Patient mit nachgewiesenem ZES und sporadischem Gastrinom, der keine schwerwiegenden Kontraindikationen zur Operation bietet, wie zum Beispiel ein deutlich erhöhtes perioperatives Risiko bei Multimorbidität, einer chirurgischen Therapie durch einen erfahrenen Operateur zugeführt werden sollte [Jensen, 2006]. Bei Diagnosestellung sind 50-70% der sporadischen Gastrinome bereits in Lymphknoten und 10 % in die Leber metastasiert. Doch auch dann ist die chirurgische Therapie noch indiziert, da der Primärtumor und Lymphknotenmetastasen entfernt werden können. Laut Jensen et al. [Jensen, 2004] liegt die biochemisch dokumentierte Heilungsrate, also der negative Sekretintest, zwischen 40-60%.

Über die Rolle der Chirurgie bei Gastrinomen im Rahmen eines MEN wird jedoch weiterhin gestritten. Es konnte gezeigt werden, dass die operative Therapie die Entwicklung von Lebermetastasen vermindern kann, die, wie bereits erwähnt, der wichtigste Prognosefaktor für das Langzeit-Überleben von Gastrinompatienten darstellen [Fraker DL, 1994; Norton 2006]. Langfristige chirurgische Heilung gab es in einer Übersichtsarbeit von Jensen aus dem Jahr 2006 auch ohne Pankreatikoduodenotomie, auch Whipple'sche Operation genannt, in 20-45% aller Patienten mit sporadischen Gastrinom, jedoch nur in 0-1% bei Patienten mit ZES im Rahmen einer MEN1-Erkrankung. Studien aus den Jahren 1990 bis 1999 zeigen, dass die

operative Heilungsrate bei Patienten mit MEN1 und ZES ohne Pankreatikoduodenektomie sehr klein ist (0-10%) [Norton, 2006].

Beim ZES im Rahmen der MEN1-Erkrankung wird die Indikation zur Operation anders gesehen. Da diese Patienten in der Regel mehrere duodenale Gastrinome haben, häufig schon mit Lymphknoten- und Lebermetastasen, und diese selten durch Operationen geheilt werden können, sind laut Jensen et al. routinemäßige explorative Laparotomien kontraindiziert, wenn die bildgebende Diagnostik keine oder Tumore von unter 2 cm Größe gezeigt hat. Bei Tumoren von über 2 cm Größe kann eine chirurgische Resektion die Entwicklung von Lebermetastasen verringern. Im Gegensatz zu dem laparoskopischen Vorgehen bei Insulinomen ist dies bei Gastrinomen aufgrund häufig multifokalen Auftretens nicht angezeigt. Außerdem kann bei Gastrinomen der Primarius häufig präoperativ nicht lokalisiert werden. Duodenale Gastrinome liegen häufig in der Submukosa und können nur durch Palpation identifiziert werden [Norton, 2005]. Eine Übersichtsarbeit von Bartsch et al. aus dem Jahr 2005 kommt nach einer retrospektiven Studie mit 26 MEN1-Patienten und ZES zu dem Ergebnis, dass eine invasive Vorgehensweise im Sinne einer frühen pyloruserhaltenden Pankreatikoduodenotomie das Überleben durch Prävention von Lebermetastasen verlängern kann [Bartsch, 2005]. Fendrich et al. postulierten 2006 an 125 Patienten mit neuroendokrinen Pankreas- und Duodenaltumoren, dass eben dieses Vorgehen bei neuroendokrinen Tumoren im Allgemeinen das Langzeitüberleben verbessert, wenn auch nicht in allen Fällen eine Heilung erreicht werden konnte [Fendrich, 2006]. Für MEN1-Patienten mit ZES kommt auch eine distale Pankreasresektion auf Höhe der Pfortader in Frage mit Enukeation aller weiteren Tumore im Pankreaskopf, eine Duodenotomie mit Entfernung aller Tumore und einer peripankreatischen Lymphknotendissektion, wie bereits Thompson et al. 1998 beschrieb [Thompson, 1998]. Die laparoskopische Resektion von NET des Pankreas ist aufgrund ihrer häufig geringen Größe ebenfalls möglich. Dazu sind jedoch die präoperative Lokalisation, ein intraoperativer laparoskopischer Ultraschall sowie ein erfahrener Operateur notwendig. Bei begründetem Verdacht auf Malignität sollte ohnehin eher ein offenchirurgisches Verfahren gewählt werden [Langer P et al., 2009].

I.1.8.2.2 Operative Strategie

Vor der Operation sollte eine Lokalisationsdiagnostik angestrebt werden. Außerdem sollte mittels biochemischer Tests, molekulargenetischer Untersuchung und nicht zuletzt der Anamnese sichergestellt werden, ob es sich um sporadische oder MEN1-assoziierte Gastrinome handelt.

Insgesamt wird in der Fachwelt eine konventionelle und nicht laparoskopische Herangehensweise präferiert [Rothmund, PdVC, Kap. 5; Norton und Jensen, 2004], da nur so die Palpation und die systematische Lymphadenektomie gewährleistet werden können.

Je nach Lokalisation des zu resezierenden Tumors wird intraoperativ unterschiedlich vorgegangen. So können beim sporadischen ZES solitäre Tumore im Pankreaskopf enukleiert, kleine duodenale Gastrinome durch eine Duodenotomie identifiziert und reseziert werden. Diskutiert werden auch die pyloruserhaltende partielle Pankreatikoduodenektomie (PPPD) oder alternativ die pankreaserhaltende Duodenektomie bei Lokalisation im Duodenum bzw. Pankreaskopfbereich. Bei Lokalisation im Pankreasschwanz wird eine milzerhaltende Pankreaslinksresektion durchgeführt. Auch wenn intraoperativ kein Primarius gefunden werden kann, sollte regelhaft eine Lymphadenektomie durchgeführt werden, um potentielle Lymphknotenmetastasen zu resezieren. Abgesehen davon wird das Thema der primären Lymphknotengastrinome nach wie vor kontrovers diskutiert [Norton JA, 2004, Arnold R, 2005]. Die chirurgische Exploration gibt dem Operateur außerdem die Möglichkeit, ein bislang nicht lokalisiertes Gastrinom durch Palpieren zu finden, zu resezieren und Lymphknotenmetastasen zu entfernen. Intraoperativ wird zudem ein Ultraschall des Pankreas und der Leber durchgeführt, um okkulte Metastasen oder Tumore, z.B. im Rahmen eines MEN1, ausfindig zu machen. Bei kleinen, nicht malignen Tumoren besteht dann auch die Möglichkeit einer Enukleation unter Erhalt des Ursprungsorgans. Jeder Tumorsektion sollte eine Lymphadenektomie um den Pankreaskopf herum, entlang des Ligamentum hepatoduodenale und interaortokaval angeschlossen werden.

Interdisziplinäre Ansätze wie die intraoperative Radiofrequenzablation oder radiologische Embolisation von Lebermetastasen werden inzwischen additiv zur Optimierung der Therapie eingesetzt.

I.1.8.2.2.1 E nukleation

Auch diese Operation beginnt mit einer queren Oberbauchlaparotomie. Nach Eintritt in das Abdomen wird die Leber palpiert und anschließend ein Kocher'sches Manöver durchgeführt, indem das Duodenum und der Pankreaskopf über die V. cava bis zur Aorta mobilisiert wird. Das Treitz'sche Band wird anschließend von rechts eröffnet. Dann erfolgt die Eröffnung der Bursa omentalis, das Lig. gastroduodenalis wird von der rechten Colonflexur bis zum mittleren Colon transversum durchtrennt, ebenso die Plica pancreatico duodenalis. Anschließend wird die V. mesenteria superior am Pankreasunterrand freigelegt. Nun werden die Strukturen im Ligamentum hepatoduodenale - der Ductus choledochus, die rechte und linke Leberarterie sowie die V. porta - freigelegt und angeschlungen. Das Lymphknotenfettgewebe wird exzidiert und in einem separaten Präparat zur histologischen Aufarbeitung gegeben. Jetzt erfolgt das Untertunneln des Pankreas auf der Pfortader. Danach kommt nach der Palpation des Pankreas der intraoperative Ultraschall zum Einsatz, um die Lokalisation des Tumors zu sichern und gegebenenfalls andere Tumore zu detektieren. Gastrinome kommen dabei typischerweise echoarm zur Darstellung. Anschließend wird nun das Pankreasparenchym im Pankreaskopf inzidiert und bis auf den kranialen Tumorrund präpariert und der Tumor sukzessive zirkulär enukleiert. Nach Absetzen des Tumors wird dieser zur Schnellschnitthistologie gesandt. Anschließend wird die Pankreaskapsel mit Einzelknopfnähten locker adaptiert und das Abdomen nach Sicherstellung der Bluttrockenheit verlassen. Abb. 10 zeigt E nukleationspräparate pankreatischer Gastrinome.

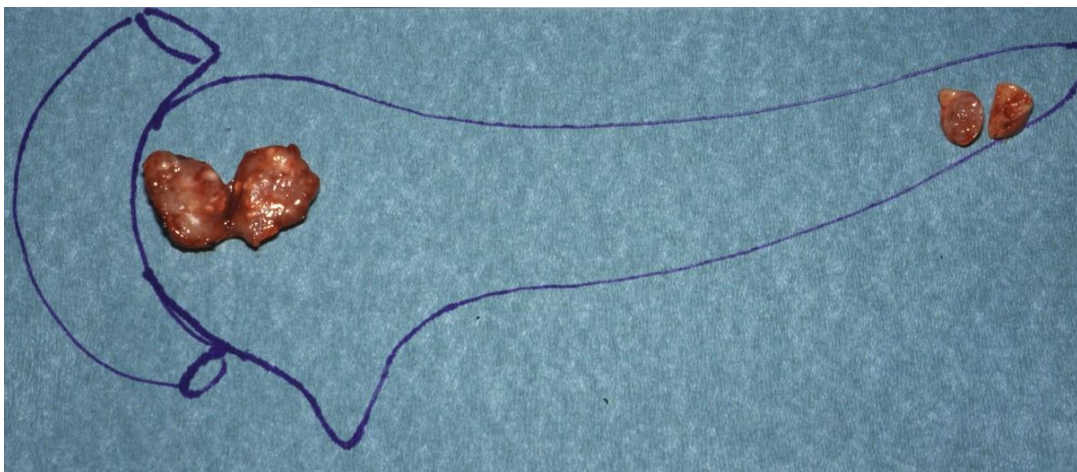


Abbildung 10 E nukleationspräparate aus dem Pankreaskopf und Pankreasschwanz

I.1.8.2.2.2 Pankreaslinksresektion

Nach Eröffnung des Abdomens mittels querer Oberbauchlaparotomie wird zunächst die Leber makroskopisch und palpatorisch beurteilt. Es wird nun das Ligamentum gastrocolicum auf die linke Flexur zu durchtrennt und die linke Colonflexur nach distal abpräpariert, in dem das Ligamentum splenocolicum durchtrennt wird. Dann Freilegen des Pankreasunterrandes. Die V. mesenterica superior wird am Pankreasunterrand dargestellt. Dann wird der Magen von der Pankreasoberkante abpräpariert und das Pankreas durchpalpiert. Anschließend wird der intraoperative Ultraschall zur Sicherung der Tumorlokalisation im Pankreasschwanz durchgeführt (s. Abb. 11). Nun werden die Gastricae-brevis-Gefäße durchtrennt und der Magen nach kranial angehoben. Dann wird die Milz aus ihrem Retroperitoneallager herausgelöst und samt Pankreasschwanz nach medial luxiert. Der Pankreasschwanz wird aus der retroperitonealen Platte herauspräpariert und die A. lienalis am Truncus coeliacus dargestellt und stammnah durchtrennt. Dann wird die V. lienalis an der Pankreasrückfläche angezügelt und durchtrennt. Anschließend wird das Pankreas zum Beispiel mit einem Stapler an der vorgesehenen Resektionsfläche durchtrennt und das Präparat zur Schnellschnitt histologie eingesandt. Nun wird die Klammernahtreihe im Bereich der Pankreasabsetzungskante mittels fortlaufender überwendlicher Naht übernäht.

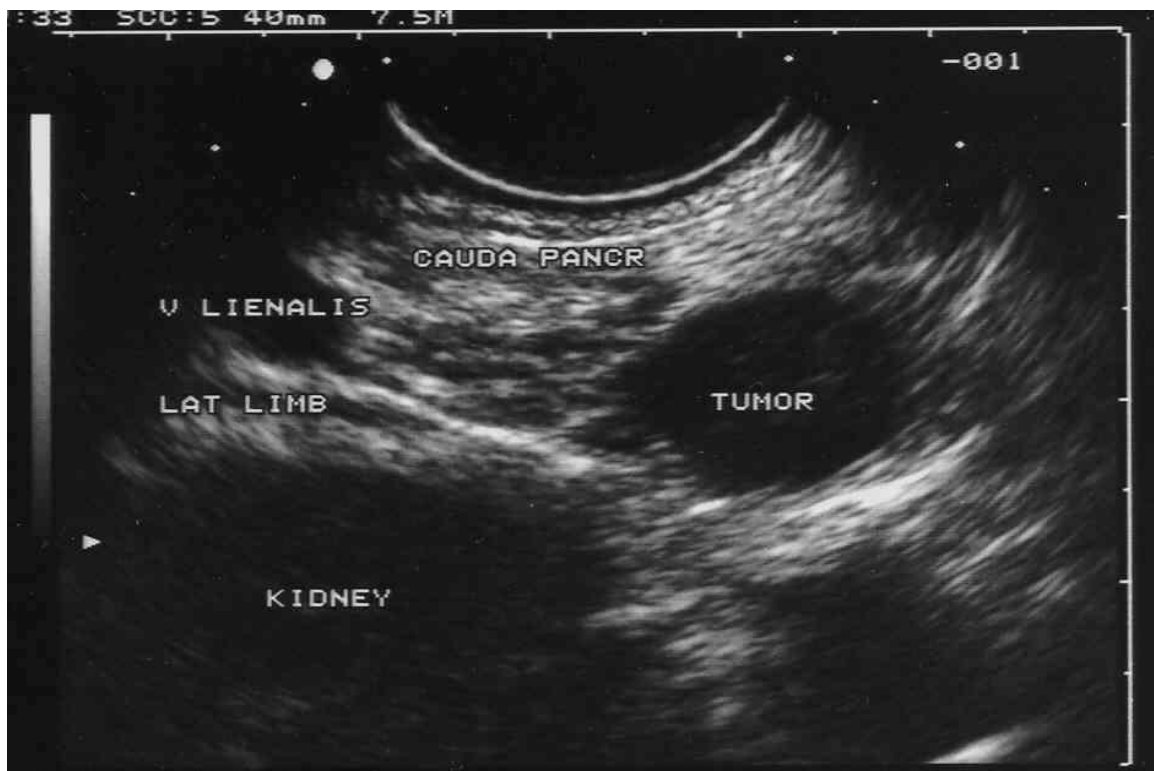


Abbildung 11 Intraoperativer Ultraschall eines Pankreasschwanztumors

I.1.8.2.2.3 Pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie (PPPD)

Bei Gastrinomen im Rahmen von MEN1 wird inzwischen die pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie (PPPD) favorisiert, da sich in diesem Fall rund 80% der Tumoren im Duodenum befinden und diese bei Erhalt des Duodenum rezidivieren können. Dabei wird, anders als bei der klassischen Whipple'schen Operation, der Pylorus des Magens komplett erhalten, so dass die Patienten sich postoperativ relativ normal ernähren können.

Nach einer queren Oberbauchlaparotomie wird nach Durchtrennung des Ligamentum falciforme zunächst die Leber palpiert und sonographiert. Wenn eine diffuse Lebermetastasierung ausgeschlossen werden kann, erfolgt die Suche nach dem Primarius. Selbst wenn in der präoperativen Diagnostik oder im intraoperativen Ultraschall (IOUS) ein Tumor im Pankreas identifiziert wurde, wird zunächst ein Kocher-Manöver ausgeführt, so dass der Pankreaskopf und das Duodenum über die V. cava bis zur Aorta hin mobilisiert wird. Nun wird die Gallenblase aus dem Gallenblasenbett mobilisiert und nach Absetzen der A. cystica und Ductus cysticus entfernt. Anschließend wird das Ligamentum hepatoduodenale sorgfältig präpariert, die A. hepatica dargestellt u. angezügelt u. der D. cysticus isoliert. Hierbei sollte eine ausgiebige Lymphadenektomie im Ligament erfolgen. Die Lymphadenektomie wird entlang der A. hepatica comm. zum Truncus coeliacus fortgesetzt. Es erfolgt daraufhin die Durchtrennung des D. choledochus und die Präparation des Pankreaskopfes wird fortgesetzt. Dann wird das Lig. gastrocolicum präpariert und der gastroduodenale Übergang mit Pylorus und Bulbus duodeni dargestellt. Anschließend kann der Magen am Bulbus duodeni abgesetzt werden. Nun erfolgen die Aufnahme der ersten Jejunalschlinge und das Mobilisieren des proximalen Jejunums. In der ersten Schlinge wird der Dünndarm durchtrennt und schließlich das proximale Jejunum zur Mesenterialwurzel hin skelettiert und mobilisiert. Danach wendet man sich wieder dem Pankreas und dem Duodenum zu. Die V. mesenterica superior und die Pfortader werden aufgesucht und das Pankreas über der Pfortader bidigital untertunnelt. Dann folgt das Durchtrennen des Pankreas. Nun wird das Jejunum unter der Mesenterialwurzel hindurch nach rechts luxiert und die Pankreaskopfresektion durch Durchtrennen des Mesoduodenum vervollständigt. Der rechts laterale Rand der Arteria mesenterica superior wird dabei aufgesucht, freipräpariert und der Pankreaskopf mitsamt dem Duodenum schließlich komplett abgesetzt. Anschließend wird der Pankreasstumpf nachmobilisiert und in die Vorderwand des Magens anastomosiert. Nach Abschluss dieser Pankreatikogastrostomie erfolgt nun die biliodigestive Anastomose. Transmesocolisch wird die proximale Jejunalschlinge in den Oberbauch mobilisiert, die

Klammernahtreihe mit Einzelknopfnähten versenkt und schließlich eine biliodigestive Anastomose in typischer End-zu-Seit-Technik mit Einzelknopfnähten angenäht. Als letzte Anastomose des Eingriffs erfolgt zur Wiederherstellung der Kontinuität des Gastrointestinaltraktes die Duodenojejunostomie, welche ebenso als End-zu-Seit-Anastomose erstellt wird. Die hergestellte postoperativen Kontinuität des Gastrointestinaltraktes zeigt Abb. 12, in Abb. 13 ist ein Resektionspräparat einer PPPD zu sehen.

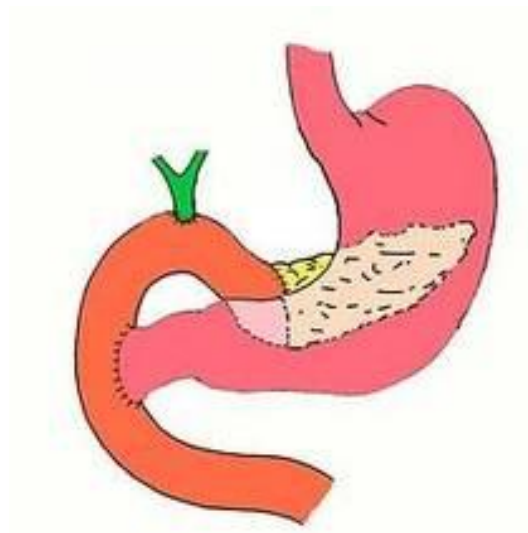


Abbildung 12 Pylorus-erhaltende partielle Duodenopancreatektomie (PPPD)



Abbildung 13 Resektionspräparat eines Gastrinoms des Pankreas

I.2 Pancreatic and Duodenal homeoboX gene 1 (PDX1)

Der Transkriptionsfaktor Pdx1 wird in der Literatur auch Ip1-1 (Insulin Promoter Factor 1), Idx-1 (Islet Duodenum homeoboX 1), Stf-1 (Somatostatin Transcription Factor 1), Iuf-1 (Insulin Upstream Factor 1) und GSF (Glucose Sensitive Factor) genannt. Das menschliche PDX1-Gen besteht aus 2 Exons, die für ein Protein mit 283 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 31 kDa in der inaktiven, 46 kDa in der aktivierten Form kodieren und liegt auf Chromosom 13q12.1 [Juan Ma et al., 2008]. Transkriptionsfaktoren sind Kontrollgene, die in der Lage sind, spezifische Sequenzen auf der DNA zu erkennen und dabei andere Gene ein- oder auszuschalten. Man kann sich vorstellen, dass durch die selektive Expression verschiedener Kontrollgene die Variabilität der Zellen und somit ihre Identität geprägt werden kann.

PDX1 wurde als β -Zell-spezifischer Aktivator für das Insulin- und Somatostatin-Gen beim Säuger entdeckt, entsprechend dem X1Hbox8 homeobox Protein bei Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) und wurde 1986 erstmals von Ohlsen beschrieben [Ohlsen; 1986, Peshavaria 1994, Miller 1994, Leonard 1993]. Wie bei anderen Transkriptionsfaktoren scheint Pdx1 an spezifische DNA-Sequenzen innerhalb der 5'-Enhancerregion von Target-Genen zu binden, um dort Proteinkomplexe zu rekrutieren, die schließlich die Transkriptionsrate des Gens regulieren. Das Gen, welches für PDX1 kodiert, ist ein zentraler Bestandteil des Parahox-Gen-Clusters von Säugetieren, bei der Maus auf Chromosom 5. So benannt wurde der Cluster, da er eine Gruppe von in der Entwicklung wichtigen Genen repräsentiert, welche außerhalb der klassischen Hox (homeobox)-Gen-Cluster gefunden wurde [Brooke, 1998]. Das Parahox-Cluster besteht aus 3 Genen: Gsh1, PDX1 und Cdx2/3, die alle in spezifischen Pankreaszellen exprimiert werden. Die Relevanz von Pdx1 wird in Pdx1-null-Mäusen deutlich, die keinen Pankreas entwickeln. Auch beim Menschen hat eine homozygote Mutation im Pdx1-Gen diese Wirkung [Schwitzgebel, 2003]. Außerdem scheinen Pdx1 auch maßgeblich an der Funktion reifer β -Zellen beteiligt zu sein. Heterozygote Missense- und Frameshift-Mutationen des Ip1-1-Gens im Menschen beeinflussen zwar nicht die Ausbildung des Pankreas, stören jedoch die Sekretion des Insulins, so dass die Individuen einen MODY4 (maturity onset diabetes of the young 4) entwickeln [Cloquet, 2000; Hani, 1999; Stoffers, 1997]. Stoffers et al. beschrieben 1997 den Fall einer Familie, in der ein Kind mit einer homozygoten inaktivierenden Pdx1-Mutation ohne Pankreas zur Welt kam, während die heterozygote Mutation im Familienstammbaum MODY4 bedingte. PDX1-Mutationen wurden auch im Falle von Typ II-Diabetes gefunden [Stoffers et al., 1997].

Außerdem ergaben Studien im Tiermodell bei Insulinresistenz, dass die Downregulation der Pdx1-Expression in den β -Zellen möglicherweise der Grund für ihre Fehlfunktion und damit von Typ II-Diabetes ist [McFarlane, Weir, 1999]. Dies zeigt die wichtige Rolle von Pdx1 nicht nur während der embryonalen Entwicklung sondern auch im adulten Pankreas. Dass Pdx1 in der Lage ist, so unterschiedlich zu funktionieren, liegt möglicherweise an seiner Fähigkeit, in unterschiedlichen Proteinkomplexen zu interagieren, die posttranskriptional verschiedene Endprodukte ergeben.

I.2.1 Pdx1 in der Entwicklung des Pankreas

Im adulten Pankreas findet man endokrine Zellen, Azinuszellen und Zellen der Ausführungsgänge. Die Analyse der Zellschicksale zeigte, dass alle endokrinen und exokrinen Zellen sowie die Zellen der Ausführungsgänge von epithelialen Pdx1-Vorläuferzellen abstammen. Pdx1 ist einer der frühesten Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung des Pankreas und lässt sich bereits am 8. Tag (E8.5) der fetalen Entwicklung in pankreatischen Vorläuferzellen nachweisen. Während der Entwicklung geht das Pankreas am Tag E8.5-9.5 als dorsale und ventrale Anlageknospe aus dem primitiven Darmrohr hervor, wie in Abb. 14 gezeigt wird.

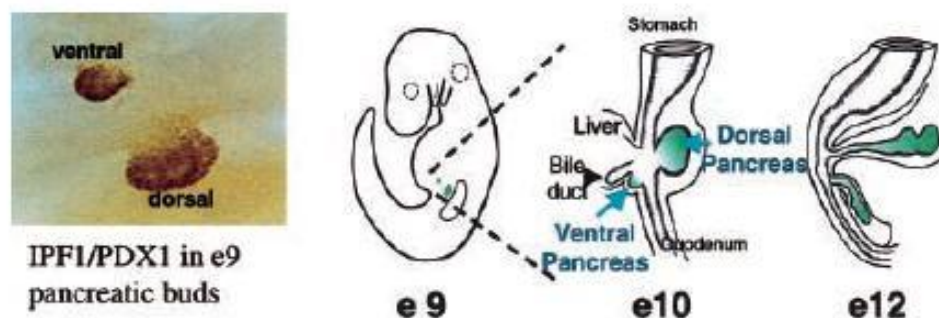


Abbildung 14 Entwicklung des Pankreas in der Maus. Pdx1 Expression in der ventralen und dorsalen Anlage des Pankreas (links) und Verschmelzung der Anlagen an E12 (rechts im Bild) [Edlund, 2001]

Während dieser frühen Phase, auch „primary transition“ genannt, kommt es zur Verzweigung der Zelllinien in die ventrale und dorsale Knospe, was aus Signalen der Notochord und dem umgebenden Mesenchym gesteuert wird. Dabei initiiert der Kontakt zwischen der Notochord

und dorsalem Endoderm die Expression von Pdx1 [Kim et al., 1997; Lammert et al., 2001]. Die Faktoren Fgf2 (fibroblast growth factor2) und Activin (transforming growth factor (TGF)- β Signalmolekül) unterdrücken die Expression vom endodermalen Sonic Hedgehog (Shh) und fördern so die Expression von Pdx1 (s. Abb. 15) [Gu, Hebrok, 2000, 2001]. Studien in Mäusen haben ergeben, dass ein früher Anstieg der Shh-Expression in einem Verlust von Pdx1 resultiert und zu einer Umwandlung von pankreatischem in duodenales Gewebe führt [Apelqvist, Hebrok 2003]. Darüber hinaus führt die kontinuierliche Expression von Shh am Tag E12.5 zu einer Reduktion der Pankreasmasse. Mäuse, die früh ektopes Shh zugeführt bekamen (Pdx1^{-/-}), entwickelten zwar noch die initiale Pankreasknospe, die Fortentwicklung in die verschiedenen Zelllinien blieb jedoch aus [Jonson, 1994]. Dies steht im Gegensatz zu den Vorgängen im adulten Pankreas, wo Hedgehog-Proteine zur Pdx1 und Insulin-Expression notwendig sind [Thomas, 2001].

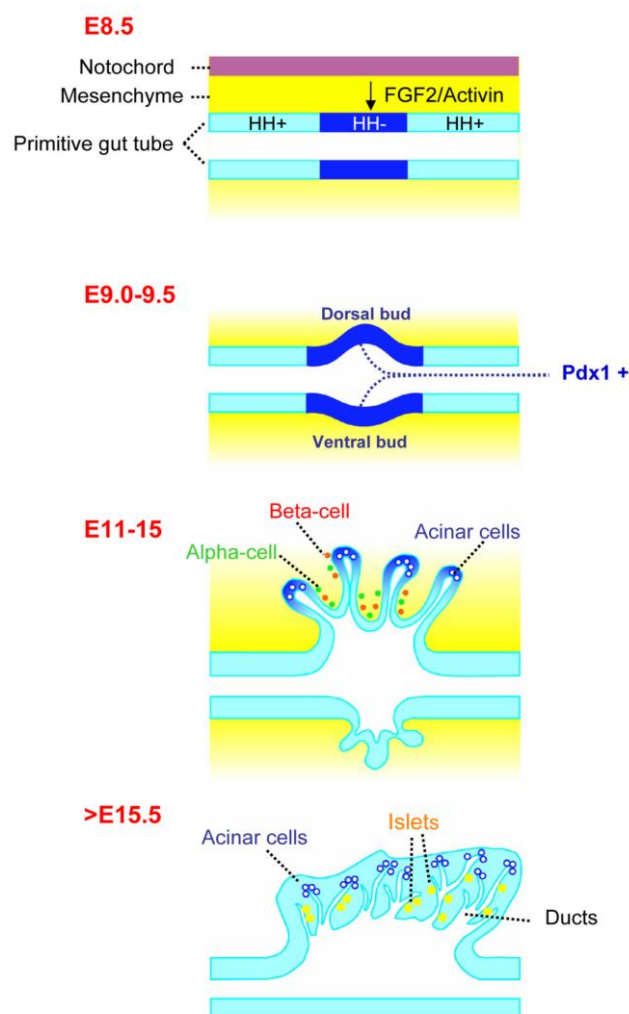


Abbildung 15 Die Entwicklung des Pankreas in Hinblick auf Pdx1 [Babu et al.]

Zwischen E13.5 und 15.5 steigt die Expression aus endokrinen und exokrinen Genprodukten sprunghaft an, ebenso die pankreatische Zellmasse. Dies wird als „secondary transition“ bezeichnet. Während der Darmrotation um E15.5 herum kommt es zu einer Verschmelzung der ventralen und dorsalen Pankreasknospe zu einem Organ [Slack, 1999]. Eine Studiengruppe um Holland herum blockierte 2002 mittels Doxycyclin Pdx1 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bildung der Knospen. Eine Blockade bei E12.5 führte zu einem Organ, das beinahe keine Azinus- und Inselzellen hatte, bei Blockade am 13.5 Entwicklungstag erhielt die Gruppe schlecht differenzierte Azinuszellen, so dass anzunehmen ist, dass Pdx1 auch nach der secondary transition wichtig für die Differenzierung von Azinus- und Inselzellen ist, während die Zellen der Ausführungsgänge zu diesem Zeitpunkt nicht wegweisend von Pdx1 abhängen [Holland, 2002].

Nach der zweiten Umwandlung nimmt Pdx1 in den Azinuszellen ab, eine kontinuierliche Expression scheint sogar schädlich zu sein [Heller, 2001].

Die Analyse von Pdx1-mutanten Mäusen etablierte Pdx1 als Schlüsselfaktor für die Entwicklung des Pankreas [Ahlgren, 1996]. In Mäusen, in denen Pdx1 ausgeschaltet wurde, entwickelten sich anfangs beide Pankreasknospen, in denen Insulin- und Glukagon-exprimierende Zellen zu beobachten sind. Die weitere Entwicklung des Pankreasepithels war jedoch blockiert und neonatale Pdx1^{-/-}-Mäuse bildeten letztendlich keinen Pankreas aus. Pdx1 spielt jedoch nicht nur in der Pankreasentwicklung, sondern auch bei der endokrinen Differenzierung des Pankreas eine wichtige Rolle [Wilson, 2003]. Pdx1 wird für die terminale Differenzierung der β -Zellen und Aufrechterhaltung der Expression β -Zell-spezifischer Gene benötigt [Ahlgren et al., 1998; Holland et al., 2002].

Die Relevanz von PDX 1 zeigt auch Abb. 16.

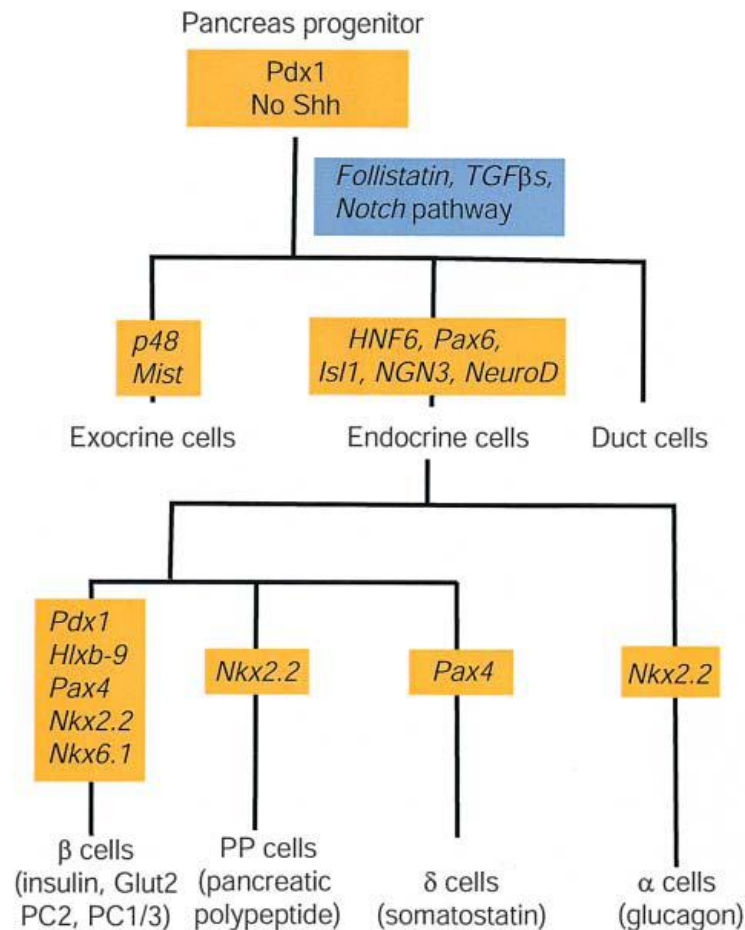


Abbildung 16 aus Johansson KA, Grapin-Botton A. Development and diseases of the pancreas, 2002

I.2.1 Pdx1 im adulten Pankreas

Nach dem Reifungsprozess (bei der Maus E 18.5) formieren sich die endokrinen Zellen zu Langerhansschen Inseln. Im adulten Pankreas findet man Pdx1 in erster Linie in den Insulinproduzierenden β -Zellen der Langerhans-Iseln, in einigen Somatostatin-exprimierenden δ -Zellen und minimal in Azinus- und Ausführungsgang-Zellen [Heller, 2001]. Haploide Pdx1^{+/-} Mäuse scheinen keine nennenswerten Einschränkungen in der Pankreasentwicklung zu haben, weisen jedoch eine stark beeinträchtigte Glukosetoleranz und im Alter abnehmende Insulinexpression auf [Johnson, 2003]. Ebendies konnte auch beim Menschen mit einer haploiden Mutation des Pdx1-Gens nachgewiesen werden [Stoffers, 1997; Hani, 1999]. Das komplette Ausschalten von Pdx1 nach der Pankreasentwicklung und in der adulten Maus führt einerseits über die Beeinflussung der Insulinexpression zu der Entwicklung von Diabetes [David A. Cano et al., 2007], andererseits treten Störungen in der Expression von Somatostatin auf [Leonard Jet al., 1993].

I.3 Sonic Hedgehog

Der Hedgehog-Signalweg wurde 1980 erstmals von Volhard und Wieschaus beschrieben, die zur Identifikation von frühembryonalen Genen die Entwicklung der Fruchtfliege *Drosophila* beobachteten. Die Larven der Hedgehog-Mutanten ähnelten mit ihrer stacheligen Form Igel, was dem Signalweg den späteren Namen – Hedgehog – verlieh [Nusslein-Volhard et al., 1980]. Seit der Entdeckung haben zahlreiche Studien gezeigt, dass der Hedgehog-Signalweg eine elementare Rolle in der Zelldifferenzierung und Organogenese, vor allem im Gastrointestinaltrakt, spielt. Zudem konnte gezeigt werden, dass der Hedgehog-Signalweg nicht nur in der embryonalen Phase, sondern auch teilweise im Erwachsenen weiterhin aktiv ist. Hh wird in der Funktion neuronaler Stammzellen des Gehirns eine Bedeutung zugemessen, ebenso in der Erneuerung von Epithelzellen des Verdauungstraktes und in der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen. Ein Fehler in der Regulation des Hh-Signalweges kann beim Erwachsenen dagegen zu verschiedenen Karzinomen führen wie Basalzellkarzinome, Gliome und nichtkleinzellige Bronchialkarzinome [Lau, 2006]. Weitere Tumoren, die mit einer Fehlfunktion des Hedgehog-Signalweges in Zusammenhang gebracht werden sind z.B. Mammakarzinome [Kubo et al., 2004], kolorektale Karzinome [Qualtrough et al., 2004], Medulloblastome, Adenokarzinome des Pankreas, Prostatakarzinome, Magenkarzinome [Myoung-Eun Han et al., 2009] und neuroendokrine Tumore des Ileums [Fendrich et al., 2007].

Beim Menschen und anderen Vertebraten spielt der Hedgehog - Signalweg eine tragende Rolle in der axialen Formation der Körperachse, des Neuralrohres, und der inneren Organe, sowie im regelrechten Ablauf der Chondrogenese, Hämatogenese, Angiogenese, Axon-Aussprossung und Stammzellhomöostase [Chiang et al., 1996; Lees et al., 2005; St-Jacques et al., 1998]. Mutationen von Genen des Hedgehog – Signalweges führen entsprechend zu Fehlbildungen, wie zum Beispiel das Pankreas annulare [Hebrok, 2002], gastrointestinale Malrotationen, anorektalen Malformationen [Lees et al., 2005], Oesophagusstenosen, Lungenanomalien und tracheoesophagealen Fisteln [Motoyama et al., 1998].

Der Hedgehog - Signalweg transferiert zelluläre Informationen von extra- nach intrazellulär. Als relevanten Hedgehog Gene sind Hedgehog (Hh), Patched (Ptch), Smoothed (Smo), Fused (Fu), Suppressor of Fused (SuFu), Hedgehog Interacting Protein (HIP1), Costal 2 (Cos-2) und Cubitus interruptus (Ci) zu nennen [Lees et al., 2005]. Es sind beim Menschen drei Hedgehog Liganden bekannt: Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog (Dhh). Sonic Hedgehog besitzt hierbei die größte Potenz [Pathi et al., 2001] und ist

auf Chromosom 7q36 aufzufinden. Diese Proteine haben eine initiale Größe von 45kDa und durchlaufen im endoplasmatischen Retikulum verschiedene posttranslationalen Modifikationen bis sie vollständig aktiv sind. Das Einfügen eines C-terminalen Cholesterols und einer N-terminalen Palmitoyl – Säure zum Beispiel macht das Protein lipophil und führt dazu, dass es leichter an der Zellmembran binden kann [Pepinsky et al., 1998; Porter et al., 1996]. Danach wird der Ligand von der Hedgehog produzierenden Zelle sekretorisch freigesetzt und kann zu seiner Erfolgszelle gelangen. Die molekulare, biochemische Interaktion zwischen den einzelnen Bestandteilen des Hedgehog-Signalweges ist also ein extra- und intrazellulär ablaufender, komplexer Prozess, wie Abb. 17 demonstriert.

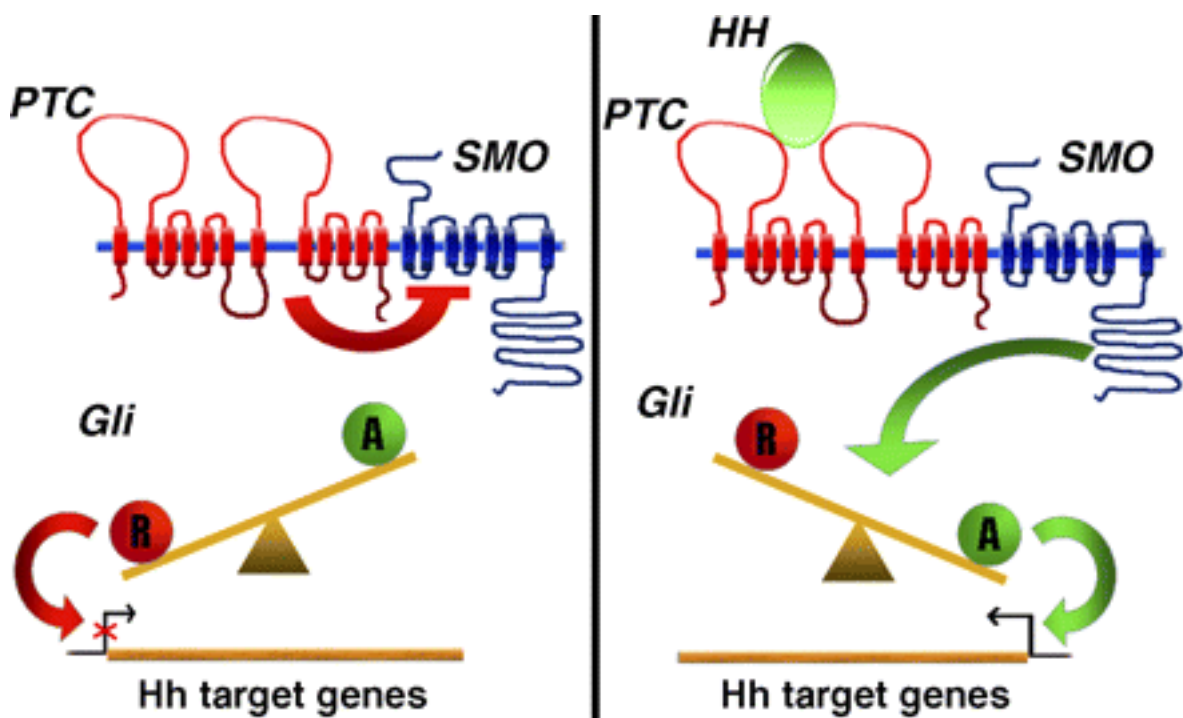


Abbildung 17 Aus Parkin CA, *The adventures of Sonic Hedgehog in development and repair*, 2008

Der Hedgehog-Signalweg reguliert die Entwicklung von Geweben und die Differenzierung von Zellen dosisabhängig. Ein Verlust von Indian Hedgehog (Ihh) führte in Tierversuchen zu einer verminderten Größe der Bauchspeicheldrüse, so dass man vermuten kann, dass Ihh für die Entwicklung des Pankreas notwendig ist. Im Gegensatz dazu unterdrückt Sonic Hedgehog (Shh) die Expression von pankreatischen Markern wie Pdx1, was zu einer Umwandlung von pankreatischem in duodenales Gewebe führt [Kawahira H, 2003].

In der Anlage für den Darm in Mausembryo wird in beinahe jeder Zelle entlang des Verdauungskanals Shh exprimiert, was seine wichtige Position in der Entwicklung desselben vermuten lässt. In der Pankreasanlage dagegen kommt Shh nicht vor, kann aber auch in der

erwachsenen Maus noch im Bereich des Magens und des Duodenums gefunden werden [Cano et al., 2007; Hebrok et al., 2000]. Dies macht deutlich, dass durch Shh eine Grenze zwischen pankreatischer und duodenaler Entwicklung gezogen wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Shh während der Entwicklung des Pankreas in Pdx1-Shh Mäusen zu Individuen mit weniger ausgeprägter Pankreasanlage führt, die Entwicklung zu gastrointestinalen Zellen jedoch verstärkt abläuft [Apelqvist et al., 1997].

II. Ziele

II.1 Gibt es einen molekularen Marker, der zwischen duodenalen und pankreatischen Gastrinomen unterscheiden kann?

II.2 Kann anhand dieses Markers bei unklarem Primarius Rückschluss auf das Ursprungsorgan genommen werden?

II.3 Kann dieser Marker helfen, das geeignete Operationsverfahren auszuwählen?

II.4 Kann eine Auswertung von Tumoren anhand des Markers die Prognose des Patienten beeinflussen?

III. Material und Methoden

III.1 Patientenkollektiv

Die Daten- und Tumorbank von Patienten, die wegen eines NPTs in der Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Philipps-Universität Marburg operiert wurden, wird seit 1987 geführt. In der Zeit bis April 2008 wurden 35 Patienten wegen pankreatischen oder duodenalen Gastrinomen oder deren Metastasen einer Operation unterzogen. Bei 7 von ihnen konnte nicht genügend Material für eine immunhistochemische Aufarbeitung gewonnen werden. Insgesamt wurde Tumorgewebe von 15 Patienten mit duodenalen und von 11 Patienten mit pankreatischen Gastrinomen untersucht. Von diesen hatten 19 Patienten sporadische Gastrinome, bei 9 Patienten kamen die Tumore im Rahmen einer genetisch nachgewiesenen MEN1-Erkrankung vor.

Außerdem wurden Lymphknotenmetastasen von 2 Patienten untersucht, deren Primarius unklar war.

Dieses Patientenkollektiv wurde ebenfalls hinsichtlich ihrer demographischen Daten, ihrer Klinik, der angewandten Operationsmethode, der endgültigen Histologie und nachfolgender Langzeitbeobachtung erfasst.

Zunächst wurde die Diagnose bei allen Patienten mittels immunhistochemischer Färbung mit Gastrin bestätigt. Die Tumorgroße wurde ermittelt und der größte Durchmesser dokumentiert. Ebenso wurde auch mit den Lymphknotenmetastasen verfahren.

Eine Heilung des ZES wurde definiert bei einem Nüchtern gastrinwert unter 125 pg/ml und einem negativen Sekretin-Stimulations-Test postoperativ und in Verlaufskontrollen.

III.2.1 HE und Immunhistochemie

Zunächst sollen von den bereits ausgesuchten NPTs Leerschnitte zur repräsentativen HE-Färbung und zur Durchführung der Pdx1-Färbung geschnitten werden.

III.2.1.1 HE

Zunächst wurde ein Schnitt von jedem Tumor zur besseren Darstellung des Gewebes per Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Dazu wurden die Schnitte zunächst in Xylol entfettet und dann in

absteigender Alkoholreihe (in %: 100, 95, 90, 80, 70, 50, 30) dehydriert. Als nächster Schritt folgte die Anfärbung in Hämatoxylin für 5 Minuten, die Bläuung in Wasser für 10 Minuten und dann die Gegenfärbung in Eosin mit Essigwasser für 30 Sekunden. Nach Spülung in destilliertem Wasser wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe rehydriert und eingedeckelt.

III.2.1.2 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie wurde die Avidin-Biotin-Complex(ABC)-Methode angewandt. Nach dem im Labor bereits etablierten Protokoll wurden die 3µm messenden Gewebeschnitte zunächst zweimal fünf Minuten in HistoClear (Xylene) entparaffinisiert und dann in absteigenden Ethanolreihen (in %: 100, 95, 90, 80, 70, 50, 30) je für 2 Minuten rehydriert. Zur Steigerung der Antigenität (antigen retrieval) wurden die Schnitte anschließend in leicht saurem Zitratpuffer erhitzt. Nach Blockierung der endogenen Peroxidase in Granulozyten und Erythrozyten wurden sämtliche Präparate in einer Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert. Nach Inkubation mit Schweineserum zur Verminderung der Hintergrundfärbung werden die Tumore dann mit den primären Antikörper jeweils über Nacht bei 4°C und anschließend mit dem biotinyliertem Sekundärantikörper (Anti-Hase, Jackson ImmunoResearch, USA) und Avidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex (Vectastain ABC-KIT, Linaris Deutschland) 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Bindungsstellen wurden nach Inkubation mit 3.3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) im Präparat rotbraun gefärbt. Bei jeder Färbung wurde als Kontrolle ein Schnitt mit gesundem Pankreasgewebe mitgefärbt, bei dem sich stets die rotbraune Anfärbung der Inselzellen ergab.

Immunhistochemie-Protokoll (von Dako)

Tag 1:

1. 2 x 5 Min. in HistoClear (Xylene) entparaffinisieren
2. Absteigende Alkoholreihe (%): 100, 95, 90, 80, 70, 50, 30

→ je 2 Min. rehydrieren

3. 2 x 5 Min. in dH₂O spülen

4. Antigendemaskierung

→ 10 Min. in der Mikrowelle unter dem Siedepunkt in Citratpuffer/PBST (pH 6,0) erhitzen

→ 20 Min. kühlen (Eis)

5. 3 x 5 Min. in dH₂O spülen

6. 10 Min. in 3%iges Peroxid (H₂O₂)

→ Blockieren der endogenen Peroxidase

7. 2 x 5 Min. in dH₂O spülen

8. 5 Min. mit PBST spülen

9. In feuchte Kammer umsetzen, mit Spezialstift markieren

10. 60 Min. in Blocking solution (10% BSA) bei Raumtemperatur inkubieren

11. Blocker entfernen

12. Prim. Antikörper mit Verdünnungslösung (Background reducing diluent, DAKO) verdünnen und auftragen (ca. 300-400 µl je Slide)

13. Über Nacht in feuchter Kammer im Kühlschrank (4°C) inkubieren.

Tag 2:

1. Prim. Antikörper entfernen

2. 3 x 5 Min. in PBST waschen

3. Sek. Antikörper in PBST + BSA 1% verdünnt auftragen und 60 Min. inkubieren

4. Nach 30 Min. ABC herstellen und 30 Min. bei Raumtemperatur immer wieder schwenken

5. Sek. Antikörper entfernen und die Slides 3 x für 5 Min. mit PBST waschen

6. ABC auftragen und 60 Min. bei Raumtemperatur inkubieren

7. ABC entfernen und 3 x für 5 Min. mit PBST waschen

8. DAB herstellen und ca. 300 µl pro Slide unter dem Mikroskop auftragen.
9. Bei ausreichender Braunfärbung Reaktion in dH₂O stoppen
10. 15 Sec. Gegenfärbung in Hämalaun (sauer, nach Mayer)
11. Anschließend 5 Min. in lauwarmem Leitungswasser bläuen (öfter wechseln).
12. 2 x 5 Min. in dH₂O spülen
13. 2 Min. in aufsteigender Alkoholreihe dehydrieren (%: 30, 50, 70, 80, 90, 95, 100)
14. 2 x 5 Min. in HistoClear
15. Eindeckeln

III.2.2 Auswertung

Die histologischen Schnitte werden anschließend lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Immunreaktivität wird in folgende drei Gruppen klassifiziert:

- : keine oder fokal schwache Färbung (< 10% positive Zellen)

+: fokal starke Färbung oder diffus schwache Färbung (> 20-50% positive Zellen)

++: diffus starke Färbung (> 50% stark positive Zellen)

III.2.3 Geräte und Zubehör

Nr.	Gerät	Hersteller
1	- 20°C Schrank, Froster	Bosch, Gerlingen, D
2	+ 4°C Schrank, KGS 3213 - 5	Liebherr, Biberach, D
3	Analysenwaage, Explorer	Ohaus, Gießen, D
4	Analysenwaage, 572	Kern, Albstadt, D
5	Eismaschine, 072816	ZIEGRA, Isernhagen, D

6	Feuchte Kammer	
7	Magnetrührer, MR 2002	Heidolph, Kehlheim, D
8	Mikroskop (binokular), 020-519.511 (1.6x, 2.5x, 10x, 40x)	Leica, Bensheim, D
9	Mikroskopkamera, DFC 290	Leica, Bensheim, D
10	Mikrowelle, 8017	Privileg, Fürth, D
11	Markerstift, Super PAP Pen	Zymed, San Francisco, USA
12	pH-Meter, Ultra Basic	Denver Instruments, Göttingen, D
13	Pipetten, Reference 2,5µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
14	Pipetten, Pipetman 20µl, 200 µl	Gilson, Villiers-le-Bel, F
15	Schüttelwasserbad, 3047	Lottermann
16	Sterile Werkbank, Nunc 20229	Fisher Scientific, Langenselbold, D
17	Tubes, Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
18	Tubes, Safe Seal Reagenzgefäße 2ml	Sarstedt, Nürnberg, D
19	Vortexer, REAX 1 DR	Heidolph, Kehlheim, D
20	Wasserbad, 1002	GFL, Burgwedel, D

III.2.4 Gebrauchswaren

Nr.	Produkt	Hersteller
1	Deckgläser, 24x24mm, 24x46mm	Menzel, Braunschweig, D
2	Handschuhe, puderfrei, Nobaglove	Kobe, Marburg, D
3	Objektträger, SuperFrost Plus	Menzel, Braunschweig, D
4	Pipettenspitzen, ep T.I.P.S Standard 200µl, 500µl	Eppendorf, Hamburg, D
5	Pipettenspitzen (gestopft), SafeSeal 20µl, 100µl	Biozym, Hessisch Oldendorf, D

6	Reaktionsgefäße/ Tubes, Eppendorftubes 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
7	Reaktionsgefäße/ Tubes, Safe Seal Reagenzgefäße 2ml	Sarstedt, Nürnberg, D
8	Reaktionsgefäße/ Tubes, PP-PCR-Gefäß 0,2ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
9	Schraubdeckelgefäß	

III.2.5 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, insofern nicht anders aufgeführt, in Analysequalität oder in Qualität für die molekularbiologische Forschung bezogen und verwendet. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Die mit *gekennzeichneten Produkte wurden bei +4°C gelagert.

Nr.	Produkt	Hersteller
1	Aqua dest. (steril)	Delta Select, Dreieich, D
2	Citrat	Sigma, München, D
3	DAB Chromogen *	Dako, Hamburg, D
4	Eosin Lösung, alkoholisch (0,5%)	Sigma - Aldrich, München, D
5	Ethanol, vergällt (≥99%)	Roth, Karlsruhe, D
6	Ethanol, absolut (≥99%)	JT Baker, Griesheim, D
7	Hämalaun, sauer nach Mayer	Dako, Glostrup, DEN
8	Methanol	Fisher Scientific, Schwerte, D
9	Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt, D
10	Salzsäure (1 mol/l)	Merck, Darmstadt, D
11	Tris (hydroxymethyl) aminomethan (99%+)	Acros Organics, Geel, B
12	Tween (20%) *	Serva, Heidelberg, D
13	Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt, D
14	Xylol (≥98%)	JT Baker, Griesheim, D

III.2.6 Puffer und Stammlösungen:

Sofern nicht anders gezeichnet, wurden die Puffer und Lösungen bei +4°C gelagert.

III.2.6.1 Puffer

Nr.	Produkt	Hersteller
1	BSA (pH 5,2)	Serva, Heidelberg, D
2	DAB Substrat Puffer	Dako, Hamburg, D
3	PBS - Dulbeco (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom, Berlin, D

III.2.6.2 Stammlösungen

Zum Ansetzen und Verdünnen von Stammlösungen wurde doppelt deionisiertem Wasser verwendet. Insofern ein bestimmter pH-Wert angestrebt wurde, wurde dieser mit Hilfe von Natriumhydroxid (NaOH) bzw. Salzsäure (HCl) eingestellt.

Nr.	Art der Lösung	Inhalt
1	Blocking Solution (10% BSA= Bovine Serum Albumin)	1g BSA ad 10ml PBST
2	Citratpuffer (pH 6,0 ±0,2)	2,94g Citrat ad 1l H ₂ O
3	0,2% Xylenyanol	
4	Natriumbicarbonat (NaHCO ₃)	ad 500ml H ₂ O
5	Methanol-Wasserstoffperoxid-Lösung 3%	10ml H ₂ O ₂ (30%) ad 100ml H ₂ O
6	PBST (1%)	500µl Tween ad 500ml PBS

III.2.7 Antikörper

Alle Antikörper und sekundären Konjugate wurden bei +4°C gelagert.

III.2.7.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Ursprungsspezies	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
α – Pdx 1	Ziege	polyklonal	1:100	Santa Cruz, Heidelberg, D
α – Shh	Ziege	polyklonal	1:50	R&D Systems

III.2.7.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
α – Ziege	Peroxidase	1:250	Vectastatin, Burlingame, USA

III.2.7.3 Sekundäre Konjugate

Konjugatkomplex	Kopplung	Verdünnung	Hersteller
Avidin-Biotin	Peroxidase	1:40	Vectastatin, Burlingame, USA
Streptavidin-Biotin	Peroxidase	1:1	Zymed, San Francisco, USA

IV. Ergebnisse

Insgesamt konnte das Gewebe von 28 Patienten für die Studie untersucht werden, die in der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Uniklinikums in Marburg an Gastrinomen operiert worden waren. Die klinischen Daten dieser Patienten können der Tabelle 7 entnommen werden.

Für die Untersuchung der Pdx1- und Shh-Expression wurden zwölf Männer und sechzehn Frauen mit einem mittleren Alter von 49 Jahren (28-73 Jahre) in die Studie aufgenommen.

Bei achtzehn fanden sich sporadische Gastrinome, zehn Patienten hatten im Rahmen einer nachgewiesenen MEN1-Mutation Gastrinome entwickelt.

Außerdem zeigte sich eine Altersdiskrepanz zwischen den Patienten mit sporadischen vs. Gastrinomen bei MEN1. Es zeigte sich, dass die Patienten zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs mit sporadischen Gastrinomen im Durchschnitt älter waren (52 vs. 45 Jahre, $p = <0,05$).

Wie von anderen Autoren schon erwähnt, waren auch in unserer Studie die duodenalen Gastrinome signifikant kleiner als die pankreatischen (6mm vs. 24 mm, $p = <0,05$).

Bei 24 von 28 Patienten zeigten sich histopathologisch maligne Gastrinome, die durch infiltratives Wachstum bzw. Metastasen gekennzeichnet waren.

Tabelle 7 Ergebnisse

Nr.	Alter (Jahren)	Geschlecht	MEN 1	Lokalisation	Tumor Größe (mm)	Untersuchtes Gewebe	Pdx1 IHC	Shh IHC	Follow-up (Monaten)
1	57	M	Nein	Pankreas	33	Primärtumor	++	-	97/AWD
2	28	W	nein	Duodenum	3	Primärtumor	-	++	112/NED
3	44	W	Nein	Pankreas	-	Leber-Metastase	+	-	132 NED
4	54	M	Nein	Duodenum	10	Primärtumor	-	++	165/AWD
5	49	W	Nein	Duodenum	15	Primärtumor	-	++	101/NED
6	33	W	Nein	Duodenum	8	Primärtumor	-	++	236/AWD
7	61	M	Nein	Unbekannt	-	LK-Metastase	-	++	47/AWD
8	59	M	Nein	Pankreas	43	Primärtumor	+	-	57/DOD

					-	LK-Metastase	+	-	
9	36	W	Nein	Unbekannt	-	LK-Metastase	-	+	71/AWD
10	64	W	Nein	Pankreas	40	Primärtumor	++	-	3/DOD
11	73	W	Nein	Pankreas	20	Primärtumor	+	-	88/NED
12	59	M	Nein	Pankreas	10	Primärtumor	++	-	15/DURC
13	70	W	Nein	Duodenum	4	Primärtumor	-	++	153/NED
14	43	M	Nein	Pankreas	-	Leber-Metastase	++	-	180/AWD
15	58	W	Nein	Pankreas	-	Leber-Metastase	+	-	1/DOD
16	52	W	Nein	Duodenum	5	Primärtumor	-	++	58/NED
					-	LK-Metastase	-	++	
17	46	W	Nein	Duodenum	5	Primärtumor	-	++	15/AWD
					-	LK-Metastase	-	++	
18	50	W	Nein	Duodenum	8	Primärtumor	-	++	15/AWD
					-	LK-Metastase	-	++	
19	59	W	Nein	Pankreas	22	Primärtumor	++	-	5/NED
20	48	M	Ja	Duodenum	10	Primärtumor	-	++	152/AWD
21	49	M	Ja	Duodenum	3	Primärtumor	-	++	117/AWD
22	29	M	Ja	Duodenum	8	Primärtumor	-	++	54/AWD
23	46	W	Ja	Duodenum	3	Primärtumor	-	++	126/AWD
24	48	M	Ja	Duodenum	6	Primärtumor	-	++	56/AWD
25	47	M	Ja	Duodenum	3	Primärtumor	-	++	118/AWD
26	45	W	Ja	Pankreas	25	Primärtumor	++	-	93/AWD
					-	LK-Metastase	++	-	
27	32	W	Ja	Pankreas	12	Primärtumor	+	-	160/AWD
28	50	M	Ja	Duodenum	6	Primärtumor	-	+	21/AWD

MEN1: Multiple endokrine Neoplasie Typ 1; LK-Metastase: Lymphknoten Metastase; DOD: Dead of disease; AWD: Alive with disease; NED: No evidence for disease, DURC: Death of unrelated cause, IHC: Immunohistochemie, Shh: Sonic hedgehog

IV.1 Pdx1

IV.1.1 Pdx1 in pankreatischen Gastrinomen und ihren Metastasen

Zum Nachweis von Pdx1 in pankreatischen Gastrinomen wurden diese immunhistochemisch angefärbt und in 2,5-facher, 10-facher und 40-facher Vergrößerung unter einem Mikroskop beurteilt. Dabei konnte in 100% der pankreatischen Gastrinome und ihrer Metastasen Pdx1-Expression nachgewiesen werden.

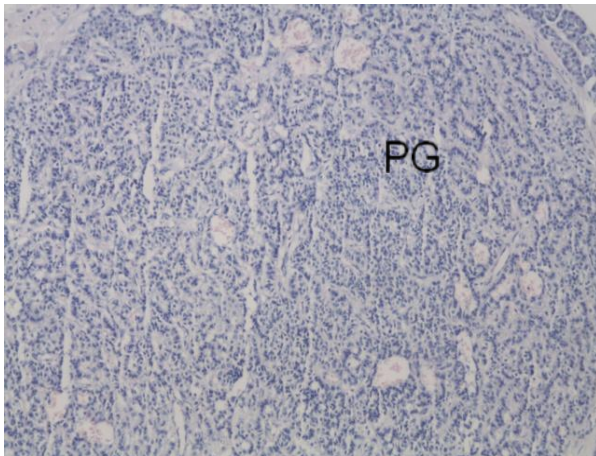


Abbildung 18 Pankreatisches Gastrinom, HE, 10x

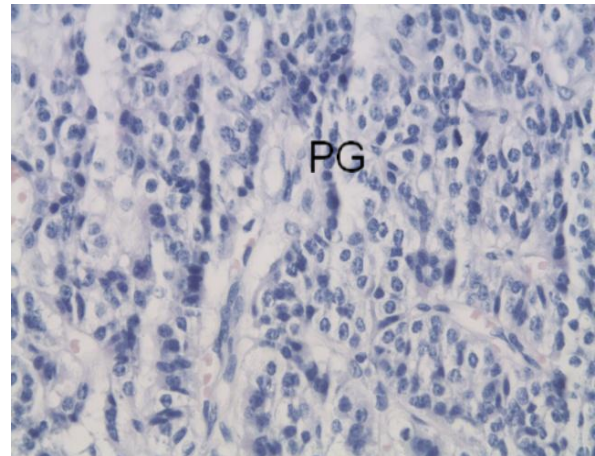


Abbildung 19 Pankreatisches Gastrinom, HE, 40x

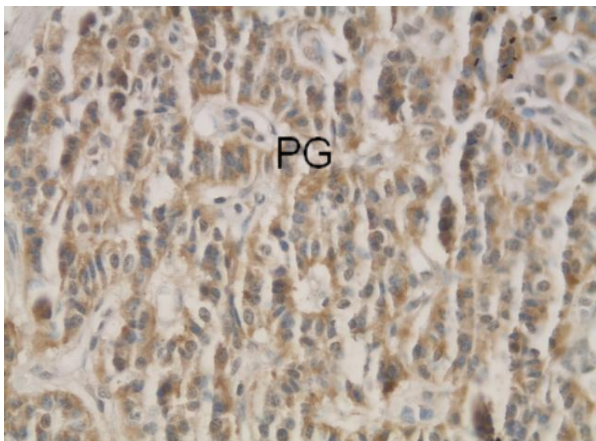


Abbildung 20 Pankreatisches Gastrinom, Pdx1 3x positiv, 40x

Davon waren 2 Lymphknotenmetastasen und 3 Lebermetastasen. Die Färbung mit Pdx1 war dreifach positiv (Abb. 20).

Pdx1-positive Tumorzellen zeigten eine typische Färbung des Zellkerns, wie man sie von Langerhansschen Inselzellen kennt. Typisch auch das solide bzw. trabekulär-pseudoglanduläre Muster der Tumoren.

IV.1.2 Pdx1 in duodenalen Gastrinomen und ihren Metastasen

In gleicher Weise wurde mit den Schnitten der duodenalen Gastrinome verfahren. Bei ihnen konnte bei keiner Färbung eine Pdx1-Expression nachgewiesen werden, wobei die Kontrolle mit dem normalen Pankreasgewebe stets das korrekte Verfahren bewies. Auch in den Metastasen der duodenalen Gastrinome (3 Lymphknoten-Metastasen) konnte Pdx1 nicht immunhistochemisch angefärbt werden.

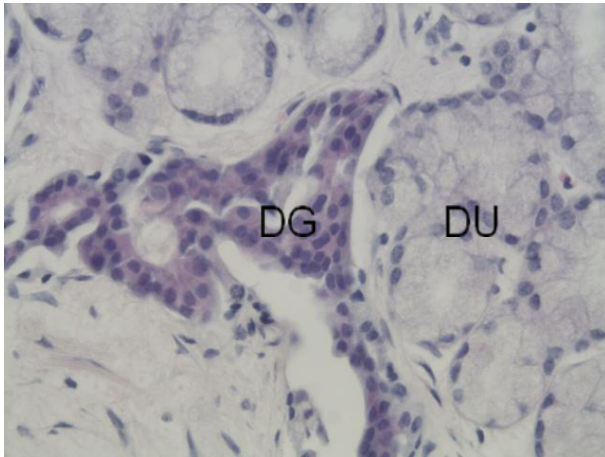


Abbildung 21 Duodenales Gastrinom (DG), HE, 10x, Typische submuköse Lage im Duodenum (DU)

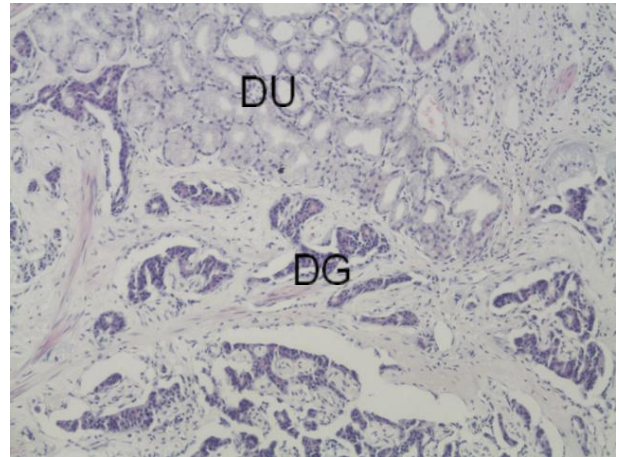


Abbildung 22 Duodenales Gastrinom (DG), HE, 40x

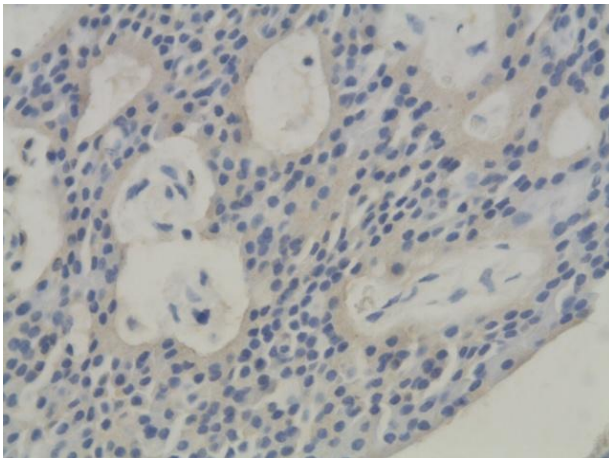


Abbildung 23 Duodenales Gastrinom, PDX1, 40x, keine Anfärbung

IV.2 Sonic Hedgehog (Shh)

IV.2.1 Sonic Hedgehog in pankreatischen Gastrinomen und deren Metastasen

Ebenfalls mit der ABC-Methode wurden die Schnitte mit Sonic Hedgehog immunhistochemisch abgefärbt. Dabei konnte Sonic Hedgehog weder in pankreatischen Gastrinomen noch in deren Metastasen nachgewiesen werden. Bei keinem der pankreatischen Gastrinome und deren Metastasen konnte eine Shh-Expression mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden.

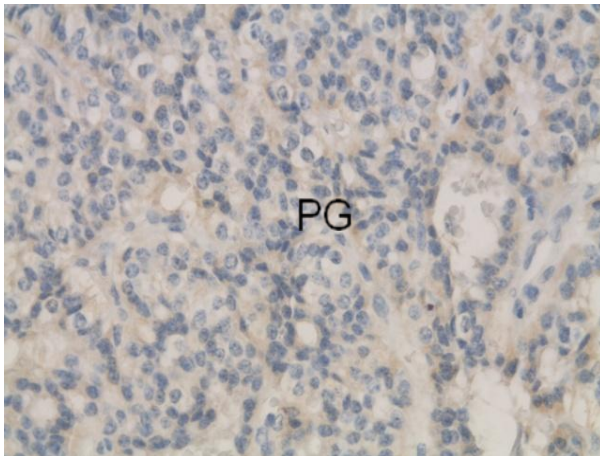


Abbildung 24 Pankreatisches Gastrinom, Shh negativ, 40x

IV.2.2 Sonic Hedgehog in duodenalen Gastrinomen und deren Metastasen

Anders verhielt es sich bei der Immunhistochemie mit Sonic Hedgehog bei duodenalen Gastrinomen. Bei ihnen konnte in allen untersuchten Tumoren Shh nachgewiesen werden. Ebenso fanden wir Shh in 100% der Lymphknotenmetastasen (n=3) und, wie erwartet, in normaler Darmschleimhaut.

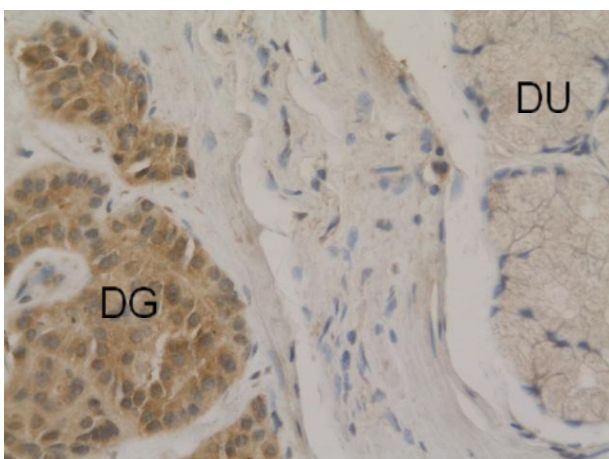


Abbildung 25 Duodenales Gastrinom, Shh, 40x, 3x positive Anfärbung

IV.3 Pdx 1 und Shh in Metastasen eines unbekanntes Primarius

Besonderes Interesse bestand in der Färbung der Metastasen eines bislang unbekanntes Primarius. In beiden untersuchten Lymphknotenmetastasen gab es keine Expression von Pdx1, aber den Nachweis von Shh, so dass die Vermutung nahe liegt, dass es sich dabei um Metastasen eines duodenalen Gastrinoms handeln muss.

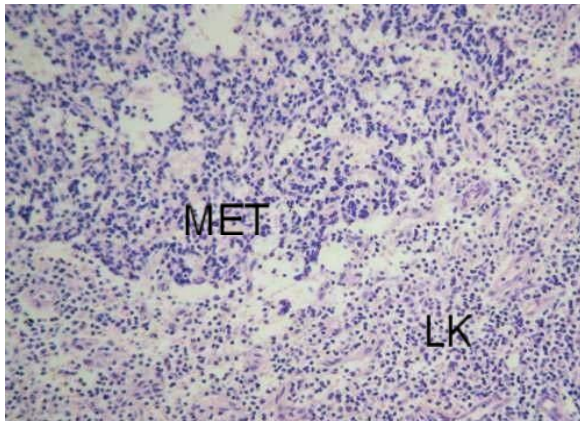


Abbildung 26 Lymphknoten-Metastase (Met) eines bislang unklaren Primarius, HE, 10x

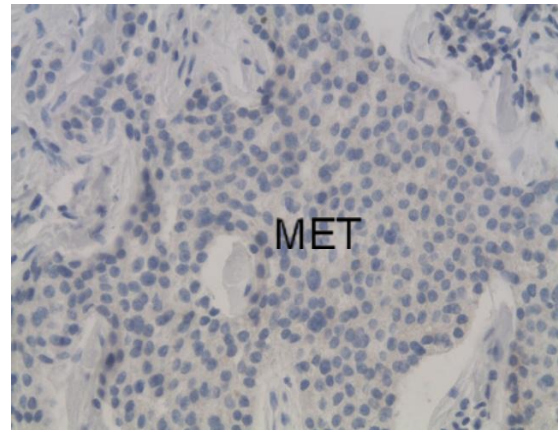


Abbildung 27 Lymphknoten-Metastase eines bislang unklaren Primarius, PDX1, 40x, eindeutig negativ

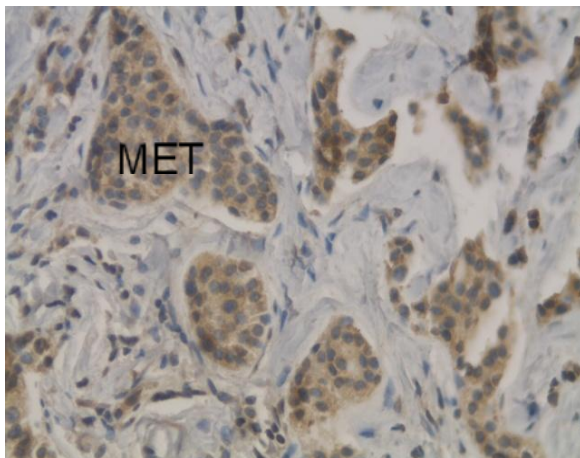


Abbildung 28 LK-Metastase eines bislang unklaren Primarius, Shh, 40x, 3x positiv

IV.4 Follow-up

Die Überlebenszeit des Patientenkollektivs korrelierte signifikant mit der Expression von Pdx1 ($p= 0.02$). Nach einem gemittelten Follow-up von 87 Monaten (1-236) waren sieben von 28 Patienten (25%), die wegen ZES operiert worden waren, laborchemisch geheilt, wobei alle von ihnen ursprünglich sporadische Gastrinome gehabt hatten.

Nach einem Mittelwert von 99 Monaten (15-236) lebten von 15 Patienten mit duodenalem Gastrinom noch 100%. Vier von ihnen gelten als geheilt, 11 lebten mit der Erkrankung. Im Gegensatz dazu waren 3 von 11 Patienten mit einem pankreatischen Gastrinom nach einem Median von 75 Monaten (1-180) an Lebermetastasen verstorben, 4 lebten mit der Erkrankung und 3 galten als geheilt. Ein Patient verstarb unabhängig von der Erkrankung.

V. Diskussion

Homeodomain-Transkriptionfaktoren sind sequenzspezifische Bindungsproteine an DNA-Strängen, die direkten Einfluss auf die embryonale Entwicklung nehmen und das Zellschicksal bestimmen. Das pancreatic-duodenal homeobox 1-Gen (Pdx1) wurde 1990 erstmals von Miller beschrieben [Miller et al., 1990], kodiert für einen der frühesten Transkriptionsfaktoren in der Entwicklung des Pankreas [Offield, 1995] und findet sich auf Chromosom 13q12 [Juan Ma et al., 2008]. Am Entwicklungstag E9.5 können bereits Pdx1-expimierende Zellen in der ventralen und dorsalen Anlage der Pankreasknospe nachgewiesen werden. An Tag E11.5 findet man auch in Zellen nahe des Ductus pancreaticus Pdx1. An Tag E16.5 beginnen sich die endokrinen PDX1-positiven Zellen als Langerhanssche Inseln zu gruppieren, die von exokrinem Pankreasgewebe umgeben sind. Nur einen Tag später (E17.5) findet man PDX1-positive Zellen nur noch in den Langerhansschen Inseln [Peshavaria, 1994]. Im Pankreas des erwachsenen Individuums ist Pdx1 hauptsächlich in β -Zellen nachweisbar, deren Aufgabe es ist, Insulin und Pankreatisches Polypeptid zu sezernieren [Leonard, 1993; Miller, 1994]. Versuche mit Knock-out-Mäusen haben ergeben, dass ein Ausschalten des Pdx1-Gens zu unterschiedlichen Zeitpunkten der embryonalen Entwicklung und auch im erwachsenen Organ zu unterschiedlichen Phänotypen führt, was die außerordentlich wichtige Rolle von Pdx 1 beweist. Ein Ausschalten von Pdx1 schon in der Keimbahn von Mäusen führte dazu, dass die Entwicklung des Pankreas schon kurz nach Bildung der Anlage sistierte, was dazu führte, dass die Mäuse ohne das Organ geboren wurden [Offield, 1995]. Ein Ansatz von Holland et al. hatte sich 2002 einer hochkomplizierten Methode bedient, die das Pdx1-Gen mittels eines Tetracyclins nur zeitweise inaktivierte [Holland, 2002]. Damit konnte gezeigt werden, dass Pdx1 auch noch nach der Bildung der Pankreasknospe unverzichtbar ist, da offenbar die Differenzierung der Zelllinien zu Insel- und Azinuszellen davon abhängt. Cano et al. bewies 2007, dass ein Ausschalten von Pdx1 im erwachsenen Individuum zu Diabetes mellitus führt, Pdx1 also für die Ausschüttung von Insulin aus den β -Zellen benötigt wird [Cano, 2007].

Im Duodenum sind Pdx1-positive Zellkerne in den Krypten nachweisbar [Miller, 1990]. Im Gegensatz zu den Nicht- β -Zellen des Pankreas persistiert die Expression von Pdx1 in den Mukosazellen des Zwölffingerdarm ein Leben lang. Am Entwicklungstag 9.5 wird Pdx1 von den meisten Zellen des Schleimhautepithels produziert, nicht jedoch von den Zellen der Adhäsionszone. In der späteren Embryonalphase und beim erwachsenen Individuum sind dann beinahe alle zilienträgenden Zellen des Duodenums Pdx1-positiv, während das

Kryptenepithel negativ ist. Die anderen Schichten der Mukosa sowie der Submukosa, der Muskularis und der Adventitia exprimieren ebenfalls kein Pdx1. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Expression von Pdx1 im Endoderm während der Entwicklung des Verdauungstraktes zwei Entwicklungswege bestimmt, den zur Epithelschicht des Duodenums und den, aus dem sich das Pankreas formt [Guz, 1995].

Die maximale Gastrinsekretion während der Entwicklung im Mutterleib wird durch das Pankreas gewährleistet. Im Antrum hingegen lässt sich beim Fötus nur sehr wenig Gastrin nachweisen. Nach der Geburt fällt das vom Pankreas produzierte Gastrin auf kaum nachweisbare Konzentrationen, im Gegenzug nimmt die Sekretion von Gastrin aus dem Antrum rapide zu. Die Sekretion im Duodenum bleibt hingegen während der gesamten Zeit konstant [Brand, 1988].

Diese Promotion ist nun die erste Studie, die zeigt, dass Pdx1 zwar in pankreatischen, nicht aber in duodenalen Gastrinomen nachweisbar ist. Nachdem dies klar geworden war, wurde ein weiterer Marker zur Unterscheidung zwischen duodenalen und pankreatischen Gastrinomen gesucht und in Sonic Hedgehog (Shh) gefunden, eines der am besten verstandenen Signalproteine des Hedgehog Signalweges. Bereits 1980 beschrieben Volhard und Wieschaus ihn bei der Beobachtung der Fruchtfliege *Drosophila* [Nusslein-Volhard et al., 1980]. Seitdem ist die tragende Rolle der Hedgehog-Proteine, zu denen auch Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog gehören (Dhh), während der Embryonalphase vom Tier und vom Menschen mannigfaltig nachgewiesen worden, vor allem in der Zelldifferenzierung und Organogenese des Gastrointestinaltraktes. Während seiner Entwicklung konnte Shh im duodenalen Gewebe nachgewiesen werden, dass zwischen der dorsalen und ventralen Pankreasanlage liegt und eine Grenze zwischen dem duodenalen und pankreatischen Gewebe darstellt [Apelqvist et al., 1997; Hebrok et al., 1998]. Es konnte sogar nachgewiesen werden, dass Sonic Hedgehog (Shh) die Expression von pankreatischen Markern wie Pdx1 unterdrückt, was im Tierversuch zu einer Umwandlung von pankreatischem in duodenales Gewebe führte [Kawahira H, 2003]. In der Pankreasanlage konnte Shh dagegen nicht nachgewiesen werden, war jedoch auch im Duodenum der adulten Maus noch nachweisbar [Cano et al., 2007; Hebrok et al., 2000]. Dies macht deutlich, dass durch Shh eine Grenze zwischen pankreatischer und duodенaler Entwicklung gezogen wird. In dieser Arbeit konnte nun mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden, dass diese Unterscheidung auch auf duodenale und pankreatische Gastrinome zutrifft, indem alle

duodenalen Gastrinome Shh-positiv, aber Pdx1-negativ waren, alle pankreatischen Gastrinome verhielten sich genau umgekehrt.

Sporadische Gastrinome entstammen meist dem Pars descendens des Duodenum und befinden sich in der Submukosa. Wie bereits erwähnt handelt es sich hierbei um eine Pdx1-negative Schicht [Guz, 1995]. Obwohl vorangegangene Studien gezeigt haben, dass duodenale und pankreatische Gastrinome gleichermaßen maligne sind, wobei 40-70% metastasieren, und die postoperative rezidivfreie Zeit ähnlich ist [Norton, 1999; Weber, 1995], ist jedoch das biologische Verhalten dieser beiden Tumorentitäten unterschiedlich. Während die meisten duodenalen Gastrinome selbst kleiner als 1 cm sind, werden bei 60 bis 80% der Patienten schon bei Diagnosestellung Lymphknotenmetastasen gefunden. Es scheint so zu sein, dass die Metastasen in den periduodenalen Lymphknoten schneller wachsen als der Primarius im Duodenum, was erklärt, wieso diese eher entdeckt werden als der Primärtumor [Anlauf, 2006].

Nachdem nachgewiesen worden war, dass Gastrin im Pankreas von erwachsenen Individuen exprimiert wird, konnte auch angenommen werden, dass sich pankreatische Gastrinome nicht durch Fehler in der Transkription aus ektope Zellen entwickeln, sondern aus bereits bestehenden organeigenen Zellen und ihrer Translationsmechanismen [Bardram, 1990]. Pankreatische Gastrinome sind mit einem Durchmesser von mehr als 2 cm in der Regel größer als duodenale. Lymphknotenmetastasen findet man in fast 60 % der Fälle bei Diagnosestellung und pankreatische Gastrinome metastasieren mit 10-20% häufiger in die Leber [Stabile, 1985]. Die 10-Jahres-Überlebensrate ist deshalb bei pankreatischen Gastrinomen mit 57% schlechter als bei Patienten mit duodenalen Gastrinomen (84%) [Weber, 1995; Yu, 1999; Norton, 2004]. Leider ist die Pathogenese dieser prognostisch wichtigen Unterschiede bei Gastrinomen auf molekularer Basis bis heute relativ unklar [Fendrich, 2007]. Laufende Studien zeigen, dass eine gesteigerte Expression von IGF (insulin-like growth factor) und bzw. oder seinem Rezeptor mit geringeren Heilungschancen, schnellerem Wachstum und früherer Metastasierung einhergehen [Furukawa, 2005]. In zwei weiteren Studien von Furukawa et al. wiesen 56% der Gastrinome im X-Chromosom einen Verlust der Heterozygotie auf (loss of heterozygosity (LOH)), 44% eine LOH auf Chromosom 1q. Beide Mutationen korrelierten signifikant mit einem aggressiveren postoperativen Tumorwachstum [Chen, 2003; Chen, 2004].

Im Patientengut dieser Promotionsarbeit hatten Patienten mit Pdx1-positiven bzw. Shh-negativen Gastrinomen eine signifikant verminderte Überlebenszeit im Vergleich mit Patienten, deren Gastrinome kein Pdx, dafür aber Shh exprimierten ($p=0,022$). Zwar bestärken Studien die Hypothese, dass es aggressive und weniger aggressive Gastrinome gibt [Weber, 1995; Yu, 1999], in der vorliegenden Arbeit ist der signifikante Überlebensvorteil aber wahrscheinlich auf das Ursprungsorgan zurückzuführen. So haben duodenale Gastrinome eine deutliche bessere Prognose durch spätere Lebermetastasierung als pankreatische Gastrinome [Weber, 1995; Yu, 1999]. Ob die Expression von Pdx1 und Shh dabei eine Rolle spielen, ist bisher nicht untersucht worden.

Bei zwei Patienten mit nachgewiesenem Zollinger-Ellison-Syndrom wurde in der Viszeralchirurgischen Abteilung des Universitätsklinikums Marburg eine explorative Laparotomie durchgeführt, bei der Lymphknotenmetastasen entfernt, der Primarius jedoch nicht gefunden werden konnte. Die Lymphknotenmetastasen wurden jeweils in der Nähe des Processus uncinatus und des Ligamentum hepatoduodenale reseziert. Bei beiden Patienten wurde eine Intraoperativer Ultraschall (IOUS) des Pankreas durchgeführt und das Pankreas durchpalpiert, außerdem wurde jeweils eine Duodenotomie durchgeführt. Dennoch konnte der Primarius nicht gefunden werden. Selbst erfahrene Chirurgen sind manchmal nicht in der Lage, das primäre Gastrinom intraoperativ zu identifizieren [Anlauf, 2005; Anlauf, 2006; Fendrich, 2007; Norton, 2003].

Diese Umstände können sowohl bei sporadischen Gastrinome auftreten als auch bei Patienten mit Gastrinomen im Rahmen eines MEN-Syndroms. Da es bei einigen Patienten trotz alleiniger Lymphknotenentfernung zu klinischer und/oder laborchemischer Heilung kam, wurde die Hypothese aufgeworfen, dass es primäre Lymphknoten-Gastrinome gibt (Norton, 2003). Diese Ansicht wurde allerdings relativiert, als bewiesen werden konnte, dass duodenale Gastrinome mitunter sehr klein sind und leicht übersehen werden können. Außerdem konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden, dass auch sehr kleine duodenale Gastrinome bereits in Lymphknoten metastasieren können (Bartsch, 2005; Akerstrom, 2002).

In den Lymphknotenmetastasen unklarer Primarien, die im Rahmen dieser Promotion untersucht wurden, war Pdx1 nicht nachweisbar, was vermuten lässt, dass es sich hierbei um Lymphknotenmetastasen von bislang unentdeckten duodenalen Gastrinomen handelt. Wenn man davon ausgeht, wird die Tatsache, dass es primäre Lymphknotengastrinome gibt, unwahrscheinlich. Es ist, wie bei den beiden Patienten, deren Gewebe im Rahmen dieser Dissertation aufgearbeitet wurde, vermutlich eher so, dass die duodenalen Gastrinome

aufgrund ihrer geringen Größe weder intraoperativ vom Operateur getastet werden, noch vom Pathologen in der histologischen Aufarbeitung identifiziert werden konnten. Obwohl es eine wachsende Beweislage für Mikrogastrinome als die Ursache von periduodenalen Lymphknotenmetastasen gibt, bleibt die Hypothese der primären Lymphknotengastrinome bestehen [Norton, 2003]. Auch heutzutage werden sicher, trotz immer genauer werdender prä- und intraoperativer Lokalisationsdiagnostik, duodenale Mikrogastrinome bei Patienten mit Zollinger-Ellison-Syndrom übersehen. Bereits von Anlauf et al. wurde 2008 die Hypothese vertreten, dass nur ein systematisches Aufarbeiten des zu untersuchenden Gewebes das Identifizieren von duodenalen Mikrogastrinomen ermöglichen würde, da die konventionelle Methode nur das Gastrin-produzierendes Tumorgewebe in Lymphknotenmetastasen und Gastrin-negative Neuroendokrine Tumoren im Pankreas bei MEN1-Patienten detektieren kann, nicht aber duodenale Kleinstgastrinome [Anlauf, 2008]. Diese Annahme wird auch durch ein Paper von Norton et al aus dem Jahre 2003 unterstützt. Darin wird eine Studie beschrieben, in der Patienten beobachtet wurde, bei denen nur die primären Lymphknotengastrinome reseziert wurden. 19 von 45 Patienten litten auch postoperativ noch an den Symptomen eines Zollinger-Ellison-Syndroms. In 5 von 19 Fällen konnte bei einer Zweitoperation ein duodenales Gastrinom als Primarius sichergestellt werden [Norton, 2003].

Die Ergebnisse dieser Dissertation könnten die Herangehensweise in der Therapie bei Patienten mit unentdecktem Primarius bei ZES beeinflussen. Wie bereits erwähnt, sind pankreatische Gastrinome meist größer als 2 cm und damit mit der heute üblichen Lokalisationsdiagnostik leicht zu identifizieren. Bei duodenalen Gastrinomen ist das häufig deutlich schwieriger und Lebermetastasen beeinflussen die Überlebenszeit der Patienten mit Gastrinomen enorm [Yu, 1999]. Dies führte dazu, dass von einigen Gruppen eine aggressivere chirurgische Herangehensweise zur Therapie des ZES propagiert wurde, um der Entwicklung von Metastasen und damit deutlicher Verschlechterung der Prognose vorzubeugen [Bartsch, 2005; Fendrich, 2006; Akerstrom, 2002]. Eine Studie von Norton et al aus dem Jahre 2006 verglich 160 Patienten mit einem Gastrinom, bei denen eine primäre Resektion durchgeführt wurde mit 35 Patienten mit identischem Staging, die nicht operiert wurden [Norton, 2006]. Nach einem Beobachtungszeitraum von 12 Jahren waren 41% der primär operierten Patienten geheilt. Zudem hatten die nicht operierten Patienten signifikant häufiger Lebermetastasen ausgebildet (29% versus 5%; $P < 0.001$). Die 15-Jahres-Überlebensrate betrug nach primärer Operation 98%, nach konservativer medikamentöser Therapie nur 74% ($P < 0.001$). Diese Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass die routinemäßige chirurgische Exploration im Rahmen eines ZES die Überlebensrate der Patienten steigert und die Zahl der voranschreitenden

Erkrankungen reduziert. Bei Patienten mit einem nicht lokalisierten primären Gastrinom und Pdx1-negativem Lymphknotenmetastasen könnte eine prophylaktische pyloruserhaltende Pankreatikoduodenektomie (pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy = PPPD) sinnvoll sein, auch, um Folgeoperationen zu vermeiden. Der Nachteil ist, dass die Auswertung mit Pdx1 und Shh mindestens einen Tag in Anspruch nimmt, um die immunhistochemische Färbung zu durchzuführen, so dass ein zweizeitiges Operationsverfahren ausgewählt werden müsste.

Imamura et al. berichteten 2005 über einen Patienten mit MEN1 und ZES, bei dem eine pankreaserhaltende Duodenektomie durchgeführt wurde, da er multiple duodenale Gastrinome hatte. Diese Methode sollte ggf. häufiger angewendet und im Rahmen einer Studie evaluiert werden, da sie eine weniger invasive Alternative zur PPPD darstellen könnte [Imamura, 2005].

Zusammenfassend konnten die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation zum ersten Mal signifikant zeigen, dass nur pankreatische und nicht duodenale Gastrinome Pdx1-positiv sind, was einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund vermuten lässt. Während die Expression von Pdx1 in pankreatischen ihren endokrinen Ursprung von den Inselzellen belegt, entwickeln sich duodenale Gastrinome offenbar aus Pdx1-negativen Zellen. Vielleicht ist dies auch der Grund für ihr unterschiedliches Wachstums- und Metastasierungsverhalten und damit die unterschiedliche Prognose. Zudem könnte die immunhistochemische Färbung mit Pdx1 bei Lymphknotenmetastasen eines nicht lokalisiertem Primarius einen Hinweis auf darauf liefern, ob dieser im Duodenum oder im Pankreas zu finden ist und so die Operationsmethode beeinflussen. Ein Problem sind sicher die geringen Fallzahlen dieser Studie, auch wenn das Färbeverhalten bei Gastrinomen hochsignifikant ist. Vielleicht sollte die Färbung mit höheren Fallzahlen wiederholt werden, was allerdings aufgrund der relativen Seltenheit der Erkrankung schwierig ist, da dieser Studie mit der NET-Datenbank des Marburger Universitätsklinikums eine ohnehin schon verhältnismäßig große Anzahl an Gastrinompatienten zur Verfügung stand.

VI. Zusammenfassung

VI. 1 Deutsche Version

Gastrinome gehören zu den neuroendokrinen Tumoren und sind eine sehr seltene Tumorart. Dies ist sicher in Grund, weshalb Gastrinome zwar schon seit 1955 bekannt und noch immer nicht ausreichend erforscht sind. Ihre Klinik wird als Zollinger-Ellison-Syndrom zusammengefasst, das sporadisch und im Rahmen einer genetischen Erkrankung, dem MEN1-Syndrom, auftreten kann. Patienten leiden nicht nur unter Reflux, Ulcera und Diarrhoen, sie müssen auch die potentielle Metastasierung, die zu 60% stattfindet, fürchten. Heilen lässt sich das ZES nur durch die komplette Resektion der Tumoren, die zu 50 - 70% in der Duodenalwand und zu 30 – 50% im Pankreas liegen. Leider sind bei Erstdiagnose häufig bereits Metastasen vorhanden, die den wichtigsten Prognosefaktor darstellen. Bislang war es nicht möglich, von den Metastasen auf die Lokalisation des Primarius zu schließen, was der Anstoß für diese Arbeit war.

Für diese Dissertation stand eine der größten Datenbanken für neuroendokrine Tumore zur Verfügung, die in der Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Philipps-Universität Marburg seit 1987 geführt wird. Trotz dieser verhältnismäßig langen Beobachtungsphase konnten bis August 2008 nur 35 Patienten mit einem Gastrinom in die Datenbank aufgenommen werden, wobei nur bei 28 von ihnen ausreichend Gewebe zu Studienzwecken gewonnen werden konnte; davon waren 15 Tumore duodenale Gastrinome, 11 pankreatische Gastrinome und 2 waren Lymphknotenmetastasen eines unbekanntes Primarius. Dies ist eine sehr kleine Fallzahl verglichen mit anderen Tumorentitäten wie zum Beispiel das Pankreaskarzinom, macht aber noch einmal die Rarität von Gastrinomen deutlich.

Die Gewebe der Patienten wurden immunhistochemisch aufgearbeitet und hinsichtlich der Anfärbarkeit mit dem Transkriptionsfaktor Pdx1 (Pancreatic and Duodenal homeobox gene 1) und einem Liganden des Hedgehog Signalwegs, Sonic Hedgehog (Shh), untersucht. Pdx1 ist ein Transkriptionsfaktor, der vor allem in der embryonalen Entwicklung des Pankreas eine tragende Rolle spielt und auch im adulten Pankreas noch in den Inselzellen nachweisbar ist, wo er maßgeblich an der Expression von Insulin beteiligt ist. Das PDX1-Gen des Menschen liegt auf Chromosom 13q12.1. Shh liegt auf Chromosom 7q36 und gehört mit Indian Hedgehog (Ihh) und Desert Hedgehog (Dhh) zu den drei Liganden des Hedgehog-Signalwegs, der zu den am besten erforschten Signalwegen des Menschen gehört. Er spielt

eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung und Organogenese und ein Fehler wird mit der Entstehung verschiedener Tumore in Zusammenhang gebracht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pdx1 in 100% aller pankreatischen Gastrinome und ihrer Metastasen und in keinem duodenalen Gastrinom nachweisbar war. Shh hingegen war in 100% aller duodenalen und in keinem der pankreatischen Gastrinome zu finden. In beiden Lymphknotenmetastasen unklarer Primarien konnte Shh nachgewiesen werden, so dass postuliert werden kann, dass es sich dabei am ehesten um Metastasen eines duodenalen Gastrinoms gehandelt haben muss.

Wir hoffen, dass dieser Umstand in der Zukunft dazu führen kann, dass Lymphknotenmetastasen eines unklaren Primarius sicher einem Ursprungsorgan zugeordnet werden können, was auf die Invasivität der chirurgischen Therapie einen immensen Einfluss haben könnte.

Ein Problem dieser Arbeit stellt sicher die niedrige Fallzahl dar. Allerdings ist es aufgrund der Seltenheit der Tumoren sehr schwer, deutlich größere Fallzahlen zusammenzutragen.

VI. 2 Englische Version

Gastrinomas are counted among the neuroendocrine tumors and are quite rare. This is surely one of the most reasons, why gastrinomas are still not sufficiently researched, although they are known since 1955. Their clinic is summarized as Zollinger-Ellison-Syndrome (ZES), which can occur sporadically and as part of a genetic disease, the MEN1 syndrome. Patients suffer not only from reflux, ulcers and diarrhea; they must also fear metastasis, which occur in 60%. Healing can only be achieved by complete resection of the tumors, which are to 50-70% in the duodenal wall and to 30-50% in the pancreas. Unfortunately, at diagnosis metastases often already exist, which are the most important prognostic factor. So far, it was not possible to conclude from the metastases to the localization of the primaries, what was the impetus for this work.

For this dissertation one of the largest databases of neuroendocrine tumors was used, which is collected in the Visceral, Thoracic and Vascular Surgery, Philipps-University Marburg since 1987. Despite this relatively long observation periods to be included in the database until August 2008, only 35 patients with a gastrinoma has been included, and from only 28 patient it was possible to obtain enough tissue for study, of which 15 were duodenal gastrinomas, 11

pancreatic gastrinomas, and 2 patients had lymph node metastases of unknown primaries. This is a very small number of cases compared with other tumors such as pancreatic cancer, which underlines the rarity of gastrinomas once again.

The tissues of the patients were processed by immunohistochemistry and were stained with the transcription factor Pdx1 (Pancreatic and duodenal homeobox gene 1) and a ligand of the Hedgehog signaling pathway, Sonic Hedgehog (Shh). Pdx1 is a transcription factor, which plays a major role especially in the embryonic development of the pancreas and also in the adult pancreas, where it is detectable in the islet cells and is involved in the expression of insulin. The PDX1 gene is located on chromosome 13q12.1 of human. Shh is located on chromosome 7q36 and is, with Indian Hedgehog (Ihh) and Desert Hedgehog (Dhh), part of the Hedgehog signaling pathway, which is one of the best understood signaling pathways in humans. It plays an important role in cell differentiation and organogenesis and is brought into connection with the development of various tumors.

In this study it could be improved, that Pdx1 was detected in 100% of pancreatic gastrinomas and their metastases and was not found in any of duodenal gastrinomas. Shh, however, was found in 100% of all duodenal and not found in any of pancreatic gastrinomas. In both lymph node metastases of unknown primaries could be detected Shh. This leads to presumption that they must have been metastases of duodenal gastrinomas.

We hope that in future these findings could help to identify lymph node metastases of an unknown primary, which could help to decrease the invasiveness of the surgical treatment.

One problem of this dissertation is surely the low number of cases, but, due to the rarity of the tumor, it would be very difficult to collect much larger number of cases.

VII. Literaturverzeichnis

A

Ahlgren U, Jonsson J, Edlund H. The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1- deficient mice. *Development* 1996; 122:1409-1416

Anlauf M, Perren A, Meyer CL, Schmid S, Saremaslani P, Kruse ML, Weihe E, Komminoth P, Heitz PU, Klöppel G, Precursor lesions in patients with multiple endocrine neoplasia type 1-associated duodenal gastrinomas, *Gastroenterology* 2005; 128:1187-1198

Apelqvist A, Ahlgren U, Edlund H. Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr Biol* 1997;7:801–804

Arnold R, Rinke A, Schmidt C, Hofbauer L, Chemotherapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;19:649–656

Arnold, *Praxis der Visceralchirurgie, Endokrine Chirurgie*, Kapitel 5.1.1

Aoyagi T, Summerskill WHJ, Gastric secretion with ulcerogenic islet tumors. Importance of basal acid output. *Arch Int Med* 1966; 117:667– 672

B

Babu D, Deering TG, Mirmira RG, 2007, A Feat of Metabolic Proportions: Pdx1 Orchestrates Islet Development and Function in the Maintenance of Glucose Homeostasis, *Mol Genet Metab.* 2007; 92(1-2): 43–55

Banasch M, Schmitz F, Diagnosis and treatment of gastrinoma in the era of proton pump inhibitors, *Wien Klin Wochenschr* 2007; 119/19–20: 573–578

Bartsch DK, Fendrich V, Langer P, Celik I, Kann PH, Rothmund M, Outcome of Duodenopancreatic Resections in Patients With Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 *Ann Surg* 2005; 242: 757–766

Binnick AN, Spencer SK, Dennison WLJ, Horton ES, Glucagonoma syndrome. Report of two cases and literature review. *Arch Dermatol* 1977; 113:749–754

Bloom SR, Polak JM, Pearse AGE, Vasoactive intestinal peptide and watery-diarrhoea syndrome, 1973; *Lancet* II: 14–16

Brooke NM, Garcia-Fernandez J, Holland PW. The parahox gene cluster is an evolutionary sister of the hox gene cluster. *Nature* 1998; 392: 920–922

C

Capella C, Polak JM, Buffa R et al, Morphologic patterns and diagnostic criteria of VIP-producing endocrine tumors. A histological, histochemical, ultrastructural and biochemical study of 32 cases. *Cancer* 1983; 52:1860–1874

Capella C, Riva C, Rindi G et al, Histopathology, hormone products, and clinicopathological profile of endocrine tumors of the upper small intestine: a study of 44 cases. *Endocr Pathol* 1991; 2:92–110

Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickham P et al, Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia type 1. *Science* 1997; 276:404-406

Clocquet AR, Egan JM, Stoffers DA, Muller DC, Wideman L, Chin GA, Clarke WL, Hanks JB, Habener JF, Elahi D. Impaired insulin secretion and increased insulin sensitivity in familial maturity onset diabetes of the young 4 (insulin promoter factor 1 gene). *Diabetes* 2000; 49: 1856–1864

D

David A. Cano et al., Pancreatic development and disease, *Gastroenterology* 2007; 132:745-762

Donow C, Pipeleers-Marichal M, Stamm B, Heitz PU, Klöppel G, Pathologie des Insulinoms und Gastrinoms. Lokalisation, Größe, Multizentrität, Assoziation mit der multiplen endokrinen Neoplasie Typ I und Malignität. *Dtsch Med Wochenschr* 1990; 115:1386–1391

Donow C, Pipeleers-Marichal MA, Schröder S, Stamm B, Heitz PU, Klöppel G, Surgical pathology of gastrinoma. Site, size, multicentricity, association with multiple endocrine neoplasia type 1, and malignancy. *Cancer* 1991; 68:1329–1334

F

Fendrich et al. Das gewandelte Verständnis der Chirurgie des Zollinger-Ellison-Syndroms. *Chirurg* 2005, 76(3):217-26

Fendrich V, Langer P, Celik I, Bartsch DK, Zielke A, Ramaswamy A, Rothmund M, An Aggressive Surgical Approach Leads to Long-term Survival in Patients With Pancreatic Endocrine Tumors, *Ann Surg* 2006; 244: 845–853

Fendrich V et al, Snail and Sonic Hedgehog activation in neuroendocrine tumors of the ileum, *Endocr Relat Cancer*. 2007 Sep; 14(3):865-74

Fendrich et al, Surgical management of pancreatic endocrine tumors, *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Jul; 6(7): 419-28

Fishbeyn VA, Norton JA, Benya RV, et al. Assessment and prediction of long-term cure in patients with Zollinger-Ellison syndrome: the best approach. *Ann Intern Med*. 1993;119:199-206.

Fleury A, Fléjou JF, Sauvanet A et al, Calcitonin-secreting tumors of the pancreas: About six cases. *Pancreas* 1998; 16:545–550

Fraker DL, Norton JA, Alexander HR, Venzon DJ, Jensen RT: Surgery in Zollinger-Ellison syndrome alters the natural history of gastrinoma. *Ann Surg* 1994; 220: 320–330

G

Gössner W, Korting GW (1960) Metastasierendes Inselzellkarzinom vom A-Zelltyp bei einem Fall von Pemphigus foliaceus mit Diabetes renalis. *Dtsch Med Wochenschr* 11:434–437

Goldman JA, Blanton WP, Hay DW, Wolfe MM. Case Report: False-Positive Secretin Stimulation Test for Gastrinoma Associated with the Use of Proton Pump Inhibitor Therapy, 2009; PMID: 19245850

Gu G, Dubauskaite J, Melton DA Direct evidence for the pancreatic lineage: NGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 2002; 129:2447-2457

H

Hebrok M, Kim SK, Melton DA. Notochord repression of endodermal sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev* 1998; 12: 1705–1713

Hebrok M, Kim SK, St Jacques B, McMahon AP, Melton DA. Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development* 2000; 127: 4905–4913

Hebrok M. Hedgehog signaling in pancreas development. *Mech Dev* 2003; 120: 45–57

Hani EH, Stoffers DA, Chevre JC, Durand E, Stanojevic V, Dina C, Habener JF, Froguel P. Defective mutations in the insulin promoter factor-1 (ipf-1) gene in late-onset type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1999; 104: R41–8

Heitz PU, Klöppel G, Häcki WH, Polak JM, Pearse AGE, Nesidioblastosis: The pathologic basis of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia in infants. Morphologic and quantitative analysis of seven cases based on specific immunostaining and electron microscopy. *Diabetes* 1977; 26:632–641

Heitz PU, Klöppel G, Polak JM, Staub JJ, Ectopic hormone production by endocrine tumors: localization of hormones at the cellular level by immunocytochemistry. *Cancer* 1981; 48:2029–2037

Heller RS, Stoffers DA, Bock T, Svenstrup K, Jensen J, Horn T, Miller CP, Habener JF, Madsen OD, Serup P. Improved glucose tolerance and acinar dysmorphogenesis by targeted expression of transcription factor pdx-1 to the exocrine pancreas. *Diabetes* 2001; 50:1553–1561.

Holland AM, Hale MA, Kagami H, Hammer RE, MacDonald RJ. Experimental control of pancreatic development and maintenance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12236-12241

I

Imamura M et al, Usefulness of selective arterial secretin injection test for localization of Zollinger-Ellison syndrome. *Ann Surg* 1987; 205:230-227

J

Jensen RT, Gardner JD, Zollinger-Ellison syndrome: clinical presentation, pathology, diagnosis and treatment. In: Dannenberg A, Zakim D (eds) *Peptic ulcer and other acid-related diseases*. Spectrum Publishing Co, New York, 1991; pp 117–211

Jensen RT, Gardner JD, Gastrinoma. In: Go VLW, Di Magno EP, Gardner JD (eds.) *The Pancreas : Biology, Pathobiology and Disease*, 2nd ed. Raven Press, New York, 1993; pp 931

Jensen RT, Gastrinoma. In: O’Shea D, Bloom SR (eds) *Bailliere’s clinical gastroenterology. Gastrointestinal endocrine tumours*, vol. 10/Nr 4. Bailliere Tindall, London Philadelphia Sydney Tokyo Toronto, 1996; pp 603–643

Jensen RT et al, Gastrinoma (Duodenal and Pancreatic), *Neuroendocrinology* 2006; 84: 173–182

Jeung Hye Han et al, Clinical Characteristics and Malignant Predictive Factors of Pancreatic Neuroendocrine Tumors, Korean J Gastroenterol 2009 Feb; 053(02): 98-105

Johansson KA, Grapin-Botton A. Development and diseases of the pancreas. Clin Genet 2002; 62: 14–23. C Blackwell Munksgaard

Johnson JD, Ahmed NT, Luciani DS, Han Z, Tran H, Fujita J, Misler S, Edlund H, Polonsky KS. Increased islet apoptosis in *pdx1*^{+/-} mice. J Clin Invest 2003; 111: 1147–1160

Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. Nature 1994; 371: 606–609

Juan Ma, Minhu Chen et al, Pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX1) functions as a tumor suppressor in gastric cancer, Carcinogenesis 2008; vol.29 no.7 pp.1327–1333

K

Kawahira H, Ma NH, Tzanakakis ES, McMahon AP, Chuang PT, Hebrok M (2003 Oct) Development: Combined activities of hedgehog signaling inhibitors regulate pancreas development, 2003 Aug ; 130(20):4871-9

Kianmanesh R et al., Surgical treatment of gastric, enteric, and pancreatic endocrine tumors Part 1. Treatment of primary endocrine tumors, J Chir (Paris). 2005 May-Jun; 142(3): 132-49

Kisker O, Weinel RJ, Geks J, Zacara F, Joseph K, Rothmund M, Value of somatostatin receptor scintigraphy for preoperative localization of carcinoids. *World J Surg* 1996; 20:162–167

Klöppe G, Höfler H, Heitz PU, Pancreatic endocrine tumours in man. In: Polak JM (ed) *Diagnostic histopathology of neuroendocrine tumours*, chapter 5. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1993; pp 91–121

Klöppe G, Heitz PU, Capella C, Solcia E, Pathology and nomenclature of human gastrointestinal neuroendocrine (carcinoid) tumors and related lesions. *World J Surg* 1996; 20:132–141

Krejs GJ, Orci L, Conlon JM et al, Somatostatinoma syndrome. Biochemical, morphologic and clinical features. *N Engl J Med* 1979; 301:285–292

L

Langer P et al, Minimally invasive resection of neuroendocrine pancreatic tumors, *Chirurg* 2009 Feb; 80(2): 105-12

Langer et al, *Praxis der Visceralchirurgie, Endokrine Chirurgie, Kap. 6*

Lau J, Kawahira H, Hebrok M, *Cell Mol Life Sci.*, Hedgehog signaling in pancreas development and disease, 2006 Mar; 63(6):642-52

Leonard J, Peers B, Johnson T, Ferreri K, Lee S, Montminy MR. Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 1275–1283

M

Macfarlane WM, Frayling TM, Ellard S, Evans JC, Allen LI, Bulman MP, Ayres S, Shepherd M, Clark P, Millward A, Demaine A, Wilkin T, Docherty K, Hattersley AT. Missense mutations in the insulin promoter factor-1 gene predispose to type 2 diabetes. *J Clin Invest* 1999; 104:R33–9

MacFarlane WM, C.M. McKinnon, Z.A. Felton-Edkins, H. Cragg, R.F. James, K. Docherty, Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells, *J. Biol. Chem.* 274, 1999; 1011–1016

Miller CP, McGehee REJ, Habener JF. Idx-1: A new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *EMBO J* 1994; 13:1145–1156

Myoung-Eun Han et al, Hedgehog Signaling Regulates the Survival of Gastric Cancer Cells by Regulating the Expression of Bcl-2, *Int J Mol Sci.* 2009 July; 10(7):3033–3043

N

Norton JA, Jensen RT. Resolved and unresolved controversies in the surgical management of patients with Zollinger-Ellison syndrome. *Ann Surg* 2004; 240:757-773

Norton et al, Surgical treatment and prognosis of gastrinoma, *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005 Oct; 19(5): 799-805.

Norton JA, Fraker DL, Alexander HR, Gibril F, Liewehr DJ, Venzon DJ, Jensen RT: Surgery increases survival in patients with gastrinoma. *Ann Surg* 2006; 244: 410–419

O

Ohlsson H, Edlund T. Sequence-specific interactions of nuclear factors with the insulin gene enhancer. *Cell* 1986; 45: 35–44

P

Pachera S, Yokoyama Y, Nishio H, Oda K, Ebata T, Igami T, Abe T, Shingu Y, Nagino M, A rare surgical case of multiple liver resections for recurrent liver metastases from pancreatic gastrinoma: liver and vena cava resection, *J Hepatobiliary Pancreat Surg.* 2009 Mar 10

Parkin CA, Ingham PW., The adventures of Sonic Hedgehog in development and repair. I. Hedgehog signaling in gastrointestinal development and disease, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008 Feb; 294(2):G363-7

Peshavaria M, Gamer L, Henderson E, Teitelman G, Wright CV, Stein R. Xihbox 8, an endoderm-specific xenopus homeodomain protein, is closely related to a mammalian insulin gene transcription factor. *Mol Endocrinol* 1994; 8: 806–816

Prinz C, *Praxis der Visceralchirurgie, Gastroenterologische Chirurgie, Kap. 27.1*

R

Roth J, Klöppel G, Madsen OD, Storch MJ, Heitz PU, Distribution patterns of proinsulin and insulin in human insulinomas: an immunohistochemical analysis in 76 tumors. *Virchows Arch Cell Pathol* 1992; 63:51–61

Rothmund M, *Praxis der Visceralchirurgie, Endokrine Chirurgie*

Ruttman E, Klöppel G, Bommer G, Kiehn M, Heitz PU, Pancreatic glucagonoma with and without syndrome. Immunocytochemical study of 5 tumour cases and review of the literature. *Virchows Arch Pathol Anat* 1980; 388:51–67

S

Schwitzgebel VM, Mamin A, Brun T, Ritz-Laser B, Zaiko M, Maret A, Jornayvaz FR, Theintz GE, Michielin O, Melloul D, Philippe J. Agenesis of human pancreas due to decreased half-life of insulin promoter factor 1. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:4398–4406

Shen HC et al, Recapitulation of pancreatic neuroendocrine tumors in human multiple endocrine neoplasia type I syndrome via Pdx1-directed inactivation of Men1, *Cancer Res* 2009; 69(5): 1858–66

Slack JM. Developmental biology of the pancreas. *Development* 1995; 121:1569–1580

Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 1997; 17: 138–139

Sugg SL, Norton JA, Fraker DL et al, A prospective study of intraoperative methods to find and resect duodenal gastrinomas. *Ann Surg* 1993; 218: 138–143

T

Thomas MK, Lee JH, Rastalsky N, Habener JF. Hedgehog signaling regulation of homeodomain protein islet duodenum homeobox-1 expression in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 2001; 142:1033–1040

W

Weir GC, Sharma A, Zangen DH, Bonner-Weir S. Transcription factor abnormalities as a cause of beta cell dysfunction in diabetes: A hypothesis. *Acta Diabetol* 1997; 34: 177–184.

Wermer P, Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands, *Am J Med.* 1954 Mar; 16(3):363-71

Wilson ME, Scheel D, German MS, Gene expression cascades in pancreatic development. *Mech Dev* 2003; 120: 65-80

Z

Zollinger RM, Ellison EH, Primary peptic ulcerations of the jejunum associated with islet cell tumors of the pancreas. *Ann Surg* 1955; 142: 709

VIII. Anhang

VIII.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Ein CT, das die Magenschleimhauthypertrophie eines Gastrinopatienten zeigt	2
Abbildung 2 Gastrinom-Dreieck (Stabile BE 1984, modifiziert durch Ramerth)	3
Abbildung 3 Kleines duodenales Gastrinom.....	6
Abbildung 4 Typische Morphologie eines Gastrinoms im fleischfarbenen Pankreasparenchym	7
Abbildung 5 Deutlich zu erkennen ist der gut differenzierte neuroendokrine Tumor im Pankreas, der gut abgrenzbar ist.....	7
Abbildung 6 Klinik des ZES	8
Abbildung 7 Sekretintest [Arnold, PdVC, Kap. 5.4]	11
Abbildung 8 SASI.....	12
Abbildung 9 Eine SMS-Szintigraphie zeigt Lebermetastasen bei einem Gastrinopatienten	13
Abbildung 10 Eukleationspräparate aus dem Pankreaskopf und Pankreasschwanz	19
Abbildung 11 Intraoperativer Ultraschall eines Pankreasschwanztumors	20
Abbildung 12 Pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie (PPPD)	22
Abbildung 13 Resektionspräparat eines Gastrinoms des Pankreas.....	22
Abbildung 14 Entwicklung des Pankreas in der Maus. Pdx1 Expression in der ventralen und dorsalen Anlage des Pankreas (links) und Verschmelzung der Anlagen an E12 (rechts im Bild) [Edlund, 2001]	24
Abbildung 15 Die Entwicklung des Pankreas in Hinblick auf Pdx1 [Babu et al.]	25
Abbildung 16 aus Johansson KA, Grapin-Botton A. Development and diseases of the pancreas, 2002.....	27
Abbildung 17 Aus Parkin CA, The adventures of Sonic Hedgehog in development and repair, 2008.....	29
Abbildung 18 Pankreatisches Gastrinom, HE, 10x.....	42
Abbildung 19 Pankreatisches Pankreatisches Gastrinom, HE, 40x.....	42
Abbildung 20 Pankreatisches Gastrinom, Pdx1 3x positiv, 40x.....	42

Abbildung 21 Duodenales Gastrinom, HE, 10x, Typische submuköse Lage im Duodenum.....	43
Abbildung 22 Duodenales Gastrinom (DG), HE, 40x.....	43
Abbildung 23 Duodenales Gastrinom, PDX1, 40x, keine Anfärbung.....	43
Abbildung 24 Pankreatisches Gastrinom, Shh negativ, 40x.....	44
Abbildung 25 Duodenales Gastrinom, Shh, 40x, 3x positive Anfärbung.....	44
Abbildung 26 Lymphknotenmetastase eines bislang unbekanntes Primarius, HE, 10x.....	45
Abbildung 27 Lymphknoten-Metastase eines bislang unklaren Primarius, PDX1, 40x, eindeutig negativ.....	45
Abbildung 28 LK-Metastase eines bislang unklaren Primarius, Shh, 40x, 3x positiv.....	45

VIII.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Klassifikation der neuroendokrinen Tumoren des Pankreas (Klöppel 2003)	4
Tabelle 2 WHO-Klassifikation neuroendokriner Tumore.....	5
Tabelle 3 Übersicht der Neuroendokrinen Tumoren des Pankreas.....	9
Tabelle 4 Literaturübersicht präoperative Lokalisation von Gastrinomen.....	14
Tabelle 5 Medikamentöse Therapie der PETs: Biotherapie.....	15
Tabelle 6 Medikamentöse Therapie der PETs: Chemotherapie.....	16
Tabelle 7 Ergebnisse	40

VIII.3 Abkürzungsverzeichnis

5- FU	5- Fluoruracil
⁹⁰ Y	radioaktives Yttrium
¹¹¹ In	radioaktives Indium
¹⁷⁷ Lu	radioaktives Lutetium

°C	Grad Celsius
%	Prozent
μ	mikro (10^{-6})
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin- Biotin- Complex
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
B	Belgien
BAO	Basic Acid Output
Bcl- 2	B- cell lymphoma/ leukemia- 2 protein
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
c	zenti (10^{-2})
CgA	Chromogranin A
Ci	Cubitus interruptus
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ca.	circa
COS-2	Costal 2
CT	Computertomographie
d	dezi (10^{-1})
D	Deutschland
D.	Ductus

Da	Dalton
DAB	3,3` - Diaminobenzidintetrahydrochloriddihydrat
D	Deutschland
d.	destillata
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
EGF	Epidermal Growth Factor
EtOH	Ethanol
et al	und andere
evtl.	eventuell
F	Frankreich
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fu	Fused
g	Gramm
Geb.	Geboren
Ggf.	gegebenenfalls
GI- Trakt	Gastrointestinaltrakt
Gli- 1, -2, -3	Glioma- associated oncogene homolog -1, -2, -3 (zink- finger- protein)
Gr.	Größe
GSF	Glucose Sensitive Factor
h	Stunde/ Stunden
H	Wasserstoff

H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin- Eosin
Hh	Hedgehog
HIP	Hedgehog Interacting Protein
HPF	High power field
Idx-1	Islet Duodenum homeoboX 1
IGF- 1	Insulin- like Growth Factor- 1
IGF- 2	Insulin- like Growth Factor- 2
IgG	Immunglobulin- G
Ihh	Indian Hedgehog
IOUS	Intraoperativer Ultraschall
Ipf-1	Insulin Promoter Factor 1
Iuf-1	Insulin Upstream Factor 1
k	Kilo (10 ³)
Kap.	Kapitel
Ki- 67	Antigen identified by monoclonal antibody Ki- 67
Konz.	Konzentration
KU	Kilo-Units
l	Liter
Lig.	Ligamentum
Lsg.	Lösung

m	Meter
m	milli (10^{-3})
M	Molar
MAO	Maximal Acid Output
MEN 1	Multiple Endokrine Neoplasien Typ 1
min.	Minute/ Minuten
MODY4	Maturity onset diabetes of young
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
MW	Mittelwert
n	nano (10^{-9})
n	Anzahl
N	Stickstoff
NaOH	Natriumhydroxid
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
neg.	negativ
NET	Neuroendokrine Tumoren
NPT	Neuroendokrine(r) Pankreastumor(en)
NF- NPT	nicht- funktionelle neuroendokrine Pankreastumoren
Nr.	Nummer
NSE	Neuronen Spezifische Enolase
O ₂	Sauerstoff
p	piko (10^{-12})
P	Phosphat

PBS	Phosphat- buffered Saline (Phosphat- gepufferte Salzlösung)
PBST	Phosphat- buffered Salin mit Tween
Pdx 1	Pancreatic and duodenal homebox 1
pH	pondus hyrogenii (negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ - Konzentration)
pos.	positiv
pp	Seiten
PP	Pankreatisches Polypeptid
PPPD	pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie
Ptc- 1	Patched- 1
Ptc- 2	Patched- 2
Ptch	Patched
PTH	Parathormon
PTH- RH	Parathormon- Releasing Hormon
PdVC	Praxis der Visceralchirurgie
RT	Raumtemperatur
(S%)	Sensitivitätsrate
s.	siehe
s. u.	siehe unten
SASI	Selektive arterielle Sekretin-Injektions-Angiographie
sek.	Sekunde/ Sekunden
Shh	Sonic Hedgehog
Smo	Smoothened

SRS	Somatostatin - Rezeptor - Szintigraphie
SuFu	Suppressor of Fused
Tab.	Tabelle
TBE	Tris- Borsäure- EDTA- Puffer
TNM (-Klassifikation)	Tumor, Lymphknoten, Metastasen
u.	und
u. a.	unter anderem
US	Ultraschall
USA	United States of America
UV	Ultraviolett
V.	Vena
Vergr.	Vergrößerung
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
ZES	Zollinger-Ellison-Syndrom

IX. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Adolph, Alter, Arnold, Aumüller, Aust, Barth, Bartsch, Basler, Baumann, Becker, Behr, Benes, Beppler, Berger, Bertalanffy, Bien, Blazek, Boudriot, Brück, Cetin, Daut, Dominguez, Donner-Banzhoff, Duda, Dünne, Eberhart, Ellenrieder, Engenhardt-Cabillic, Fendrich, Fensterer, Fuchs-Winkelmann, Geks, Gerdes, Gress, Grimm, Gotzen, Görg, Görg, Hassan, Herzum, Höffken, Hörle, Hofbauer, Hoffmann, Hofmann, Hoyer, Kalmus, Kalinowski, Kanngiesser, Kern, Kill, Klaus, Klose, Köhler, Koolmann, Kretschmer, Kroh, Kühne, Kühnert, Kuhlmann, Kwee, Langer, Lemke, Lohoff, Lukasewitz, Maier, Maisch, Max, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Nachtigall, Neelsen, Neubauer, Oertel, Printz, Renz, Richter, Röhm, Rolfes, Rominger, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schierl, Schlosser, Schnabel, Schneider, Seitz, Spies, Steinfeldt, Steiniger, Steinkamp, Stiletto, Tackenberg, Torossian, Vogelmeier, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wilke, Wulf, Wündisch, Zentgraf, Zettl, Zwiorek

X. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Detlef K. Bartsch, meinem Chef und dem Direktor der Klinik für Vizeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg, für die Möglichkeit, meine Promotion an seiner Klinik durchzuführen.

Ausserdem danke ich Herrn Prof. Dr. med. Matthias Rothmund, dem ehemaligen Direktor der Klinik für Vizeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg, und jetzigen Dekan für die Überlassung des interessanten Themas und die Vermittlung der Begeisterung für das chirurgische Fach schon im Studium.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Volker Fendrich, meinem Doktorvater und Betreuer und Oberarzt in der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg für die hervorragende Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit, für die konstruktive Kritik, für die Vermittlung seines Fachwissens und für die Weitergabe der Begeisterung für das chirurgische Fach.

Vor allem aber danke ich meinem Ehemann, Heiko Ramerth, ohne dessen unermüdliche Motivation und Unterstützung die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre, für seine unendliche Geduld, den sanften aber stetigen Druck und die Kraft, die er mir jeden Tag aufs Neue schenkt.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern Anne Berti und Luciano Giustino Temistocle Berti, die mich mein Leben lang bedingungslos unterstützt und an mich geglaubt haben, sowie meinen Geschwistern, Dipl. Ing. Stefanie Gregory-Berti und Dipl. Ing. Nicolai Lorenzo Berti, die für alle Sorgen stets ein offenes Ohr und einen guten Rat hatten.

Ich danke auch den Mitarbeiterinnen des Labors für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg für ihre Hilfestellung bei Problemlösungen und dass sie mich an ihrer langjährigen Erfahrung teilhaben ließen. Diese sind Frau Elvira Matthäi, Frau Brunhilde Chaloupka und Frau Dr. Emily Slater sowie Frau Dorothee Bonnorden aus dem Labor für Gastroenterologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg.