

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

**Untersuchung
des Histonmodifikationsmusters
beim pankreatischen Hyperinsulinismus**

Dissertation

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

vorgelegt von

Kourosh Roushan

2017

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

gez.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. A. Raffel

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. W. A. Schulz

*Es gibt so viele Wahrheiten im Leben,
da braucht man sich der Lüge nicht zu bedienen.*

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Raffel A, Krausch M, Roushan K, Anlauf M, Henopp T, Hafner D, Lehwald N, Kropil F, Schott M, Eisenberger CF *et al*: **Global histone modification pattern predicts poor prognosis in organic hyperinsulinism**. *Horm Metab Res* 2011, **43**(12):858-864

Raffel A, Krausch M, Roushan K, Anlauf M, Schott M, Cupisti K, Knoefel WT, Stoecklein NH: **Histon-Modifikationsmuster beim organischen Hyperinsulinismus**. *Deutscher Chirurgenkongress 2012; Berlin*

Zusammenfassung

Neuroendokrine, insulinproduzierende Tumore des Pankreas sind seltene Tumorentitäten, die hinsichtlich der Einordnung ihrer Dignität eine Herausforderung darstellen. Wir untersuchten das Histonmodifikationsmuster bei 63 Patienten mit einem Insulinom als Ursache für einen pankreatischen Hyperinsulinismus. Bei diesen Patienten wurde der Zusammenhang des globalen Histonmodifikationsmusters auf ihre Prognoserelevanz untersucht. Weiterhin sollte ihre Aussagekraft, benigne von malignen Insulinomen unterscheiden zu können, überprüft werden. Es wurden *tissue microarrays* (TMA) von Pankreasnormalgewebe, Primärtumorgewebe, Lymphknoten- und Lebermetastasengewebe erstellt und die Tumore nach der WHO Klassifikation von 2004 und der TNM-Klassifikation von 2006/ 2007 eingeteilt. Eine immunhistochemische ABC-Färbung für die Histonmodifikationen H3 K9 Ac, H3 K18 Ac, H4 K12 Ac, H3 K4 diMe und H4 R3 diMe wurde angefertigt. Im Anschluss wurden die ermittelten Färbungsscores mit den klinischen Verlaufsdaten verglichen.

Im Vergleich der Gewebearten konnten bei der Expression aller Histonmodifikationen signifikant unterschiedliche Medianwerte festgestellt werden (H3 K9 Ac, $p < 0,005$; H3 K18 Ac, $p < 0,005$; H4 K12 Ac, $p < 0,01$; H4 R3 diMe, $p < 0,005$), außer bei H3 K4 diMe ($p < 0,18$). Unter ausschließlicher Berücksichtigung der Primärtumorgewebe konnte ein signifikant besseres Überleben bei Patienten mit mehr als 15% positiver Zellen bei der Histonfärbung H3 K9 Ac ($p < 0,01$) und bei Patienten mit einem höheren Expressionsscore als 8 bei der Histonfärbung H3 K18 Ac ($p < 0,04$) gezeigt werden. Die WHO Klassifikation von 2004, die TNM Klassifikation von 2006/ 2007, das Patientenalter, die Tumorlokalisation und die Operationsmethode zeigten ebenfalls eine statistisch signifikante prognostische Relevanz.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Bestimmung des globalen Histonmodifikationsmusters bei Insulinomen einen unabhängigen Prognosemarker (H3 K9 Ac, H3 K18 Ac) bieten kann. Dies gilt es in kommenden Untersuchungen zu überprüfen.

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Complex	NEC	Neuroendokrines Karzinom
Ac	Acetylrest	NEN	Neuroendokrine Neoplasie
DNMT	DNA-Methyltransferase	NET	Neuroendokriner Tumor
diMe	Dimethylrest	pd	poorly differentiated – schlecht differenziert
GEP	gastro-entero-pankreatisches System	PET	Neuroendokriner Tumor des Pankreas
H	Histon	R	Argininrest
HAT	Histonacetyltransferase	TMA	tissue microarray
H.E.	Hämalaun-Eosin	ub	unknown behaviour – unklares Verhalten
HDAC	Histondeacetylase	UKD	Uniklinikum Düsseldorf
HME	Histonmodifikationsenzym	Uk-SH Kiel	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
HPF	high-power fields	wd	well differentiated – gut differenziert
K	Lysinrest		
MEN-1	multiple endokrine Neoplasie Typ 1		

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1. Einführung.....	5
1.2. Neuroendokrine Tumore (NET).....	6
1.2.1. Ätiologie / Epidemiologie.....	6
1.3. Neuroendokrine Tumore des Pankreas (PET).....	7
1.3.1. Ätiologie / Epidemiologie.....	7
1.4. Klassifikation neuroendokriner Tumore.....	8
1.4.1. WHO Klassifikation (2004).....	9
1.4.2. TNM Klassifikation (2006/2007).....	11
1.5. Insulinome des Pankreas.....	13
1.5.1. Ätiologie / Epidemiologie.....	13
1.5.2. Klinik.....	13
1.5.3. Diagnostik.....	15
1.5.4. Therapie.....	16
1.5.5. Einteilung nach der WHO-Klassifikation (2004).....	17
1.5.2.1. Gut differenzierte, benigne Insulinome (wd PET).....	17
1.5.2.2. Gut differenzierte Insulinome mit unklarem Verhalten (wd PET ub).....	18
1.5.2.3. Maligne Insulinome (wd PEC; pd PEC).....	19
1.6. Differentialdiagnosen: Nesdioblastose, Pankreasadenomatose, Insulinomatose.....	20
1.7. Prognosemarker neuroendokriner Tumore.....	22
1.7.1. Etablierte Prognosemarker neuroendokriner Tumore: Ki-67 / MiB-1.....	22
1.7.2. Detektion neuer Prognosemarker beim Insulinom: Histone.....	22
1.7.2.1. Grundlagen.....	22
1.7.2.2. Regulationsmechanismen.....	23

1.8. Ziele der Studie.....	24
2. Patienten, Material und Methoden	26
2.1. Patienten	26
2.2. Gewebeaufbereitung	27
2.2.1. tissue microarray (TMA)	27
2.2.1.1. Vorbereitung.....	28
2.2.1.2. Durchführung	30
2.2.2. Hämalaun-Eosin-Färbung	31
2.2.3. Synaptophysin-Färbung	32
2.3. Immunhistologische Färbung.....	33
2.3.1. Avidin-Biotin-Complex-Färbemethode.....	33
2.3.1.1. Reagenzien.....	34
2.3.1.2. Protokoll.....	35
2.4. Auswertung.....	36
2.4.1. Mikroskopie / EDV-basierte Auswertung	36
2.4.2. Beurteilung der Expression.....	37
2.4.3. Statistische Analysen.....	38
3. Ergebnisse.....	39
3.1. Patientenkollektiv.....	39
3.2. Outcome.....	41
3.2.1. WHO (2004).....	41
3.2.2. TNM (2006/2007).....	42
3.2.3. Klinische Parameter.....	43
3.3. Histonmodifikationen: Expression.....	47
3.3.1. H4 (acetyl K12).....	48

3.3.2. H3 (acetyl K18).....	50
3.3.3. H3 (dimethyl K4).....	51
3.3.4. H3 (acetyl K9).....	53
3.3.5. H4 (dimethyl R3(Arg3)).....	55
3.4. Histonexpression & Survival.....	56
4. Diskussion.....	58
4.1. Klinische Daten.....	58
4.1.1. Patientenkollektiv.....	58
4.1.2. Outcome.....	58
4.2. Histonmodifikationen.....	60
4.2.1. Expressionsmuster der Insulinome.....	60
4.2.2. Tumorrelevanz.....	62
4.3. Resümee.....	65
Literaturverzeichnis.....	67

1. Einleitung

1.1. Einführung

Neuroendokrine Tumore (NET) besitzen wie die Karzinome und Sarkome ein malignes Potential, weisen jedoch ein ausgeprägt langsames Wachstum auf. Diese Besonderheit der NET lässt sich gut mit dem Begriff *cancers in slow motion* beschreiben [1]. Die Inzidenz liegt bei etwa 1 – 4 Fällen pro 100.000 Einwohnern [2, 3]. Da es sich somit um sehr seltene Tumorentitäten handelt, mangelte es lange Zeit an einer einheitlichen Klassifikation und international anerkannten Richtlinien zur Diagnostik und Therapie. Statistisch gesehen wird ein niedergelassener Arzt in Deutschland maximal zweimal in 50 Jahren mit solch einer Tumorentität konfrontiert.

Ein im Frühstadium diagnostiziertes Malignom ist durch eine vollständige onkologisch-operative Entfernung des Primärtumors kurativ zu behandeln. Spätere Stadien können durch unkontrolliertes, invasives Wachstum über die Organgrenze hinaus und durch Invasion in abführende Gefäßsysteme, wie Lymphangiosis und Angioinvasion, Metastasen bilden. Dies erfordert als nunmehr systemische Erkrankung des Gesamtorganismus grundlegend verschiedene, weitaus aufwendigere Therapiekonzepte (u.a. kombinierte Radio-Chemo-Therapien, Antikörpertherapien etc.). Dennoch können diese Maßnahmen einen möglichen letalen Ausgang der Krankheit nicht immer verhindern [4]. Nicht jeder Tumor metastasiert. Die Metastasenbildung ist vielmehr ein komplexer, mehrstufiger Prozess [5, 6]. Ein anfänglich benigner Tumor weist mit der Zeit ein erhöhtes Malignitätsrisiko auf. Somit ist eine frühzeitige Erkennung entscheidend für den Erfolg der Therapie. Aufwendige, sehr teure und langjährige Therapiemaßnahmen lassen sich durch solche Maßnahmen eventuell abwenden. Darüber hinaus gilt es zu berücksichtigen, dass maligne Tumore, zusätzlich zur verkürzten Lebensdauer, einen weitaus größeren Einschnitt in der Lebensqualität für den Patienten bedeuten als benigne. Das ergibt sich nicht nur aus dem aggressiveren Verhalten der Erkrankung, wie beispielsweise bei einem Karzinoidsyndrom, sondern auch aus den hierdurch bedingten intensiveren Therapiemaßnahmen, wie einer radikalen, onkologischen Chirurgie oder intensivierten Radio-Chemo-Therapie.

Aus diesen Gründen ist es erforderlich die Tumordignität zu bestimmen, mit dem Ziel einer adäquaten, stadiengerechten Therapie. Die Dignitätseinteilung neuroendokriner Tumoren erweist sich als schwierig. Vielfältige Versuche zur Einteilung wurden bisher unternommen. Organisationen wie die „European Neuroendocrine Tumor Society“ (ENETS) und das deutsche „NET-Register“ der „Arbeitsgemeinschaft Neuroendokrine Gastrointestinale Tumore in der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie“ widmen sich dieser Problematik. Neben dem Aufbau einer Tumordatenbank bestehen die primären Ziele darin Diagnostik und Therapie im internationalen, interdisziplinären und wissenschaftlichen Kontext zu verbessern. Auch die Tumorbiologie ist hierbei von Interesse. Die Übergänge zwischen benignen und malignen Tumoren scheinen fließend zu sein. Für das teils unterschiedlich maligne Verhalten gibt es noch keine eindeutige Erklärung.

1.2. Neuroendokrine Tumore (NET)

1.2.1. Ätiologie / Epidemiologie

Neuroendokrine Tumore (NET) finden sich am häufigsten im gastro-entero-pankreatischen System (GEP) – hier beläuft sich die Zahl positiver Befunde auf 0,1 – 0,3 % aller Obduktionen [7, 8]. Die Appendix gilt als häufigste gastrointestinale Lokalisation mit einer auf 300 Appendektomien positiven Histologie (45 %). Die weiteren Lokalisationen verteilen sich in abnehmender Häufigkeit auf Jejunum und Ileum (25 %), Pankreas (18 – 20 %), Kolon und Rektum (5 %), Duodenum (2 – 3 %) und Magen (2 – 3 %) [8, 9]. In weniger als 2 % der Fälle sind Ösophagus und Gallengangsystem betroffen. Extragastrointestinale Lokalisationen finden sich im Bronchialsystem, Thymus und Ovarien in ca. 10 % der Fälle [7]. In der Regel treten NET sporadisch und vermehrt im hohen Lebensalter auf, wobei Frauen und Männer gleichermaßen betroffen sind. Eine seltene genetische Ursache lässt sich im Rahmen der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN-1) durch eine Mutation im Menin Gen auf Chromosom 11q13 ausmachen [10-12]. Hier finden sich Tumore ausgehend von endokrinen Zellen oft gleichzeitig in verschiedenen Organen – am häufigsten in Nebenschilddrüse, dem gastroenteropankreatischen System und Hypophyse. Gelegentlich finden sich auch Tumore in Nebenniere, Bronchialsystem und Thymus.

1.3. Neuroendokrine Tumore des Pankreas (PET)

1.3.1. Ätiologie / Epidemiologie

Die meisten hormonaktiven NET befinden sich in Duodenum und Pankreas. Das Pankreas nimmt hierbei eine Sonderstellung ein, da es mindestens 5 verschiedene neuroendokrine Zelltypen aufweist mit unterschiedlicher Hormonproduktion (siehe Tabelle 1) – wie z. B. Insulin-produzierende β -Zellen. Das endokrine Pankreas wurde in seinen unterschiedlichen Wirkweisen und pathophysiologischen Abläufen erst Ende des 19. Jahrhunderts entdeckt. Durch Langerhans wurden 1869 vom azinären Drüsenanteil des Pankreas getrennte Zellanhäufungen beschrieben [13]. Von diesen, später dann als „Inseln“ bzw. „Langerhans'sche Inseln“ bezeichneten, Zellverbänden nehmen die endokrinen Tumore im Pankreas ihren Ausgang – Albert George Nicholls beschrieb erstmalig 1902, im Rahmen einer Autopsie, den Zufallsbefund eines Adenoms, ausgehend von den Langerhans'schen Inseln [14]. Sie produzieren und sezernieren das Hormon der Ausgangszelle und werden nach diesem Hormon benannt (z.B. Insulinom, Gastrinom, etc.) [15]. Selten produziert ein NET des Pankreas (PET – *pancreatic endocrine tumors*) mehrere Hormone gleichzeitig. Die meisten PET werden durch ihre Hormonaktivität klinisch auffällig, nämlich in 4 von 5 Fällen. Dabei bedingt das jeweilige, vom Tumor produzierte Hormon ein typisches klinisches Syndrom. Hierbei seien exemplarisch das Erythema necrolyticans migrans beim Glukagonom und der hypoglykämische Hyperinsulinismus beim Insulinom genannt [16].

Die Prävalenz aller PET – sowohl hormonaktiv als auch hormoninaktiv – beträgt 3/100.000, bei zur Zeit steigender Inzidenz, wahrscheinlich auch aufgrund der zunehmenden nationalen und internationalen Vernetzung in Form von ENETS und dem stetigen Wissenszuwachs über das Deutsche NET-Register [17]. Männer und Frauen zwischen dem 20. und 80. Lebensjahr sind gleichermaßen betroffen. Pathogenetisch lassen sich häufige, sporadische, solitäre Formen von seltenen, hereditären, multipel auftretenden Formen im Rahmen einer MEN-1 Erkrankung (ca. 10 %) unterscheiden. Bisher sind Ätiologie und Pathogenese der sporadischen PET weitgehend unbekannt. Teilweise wurde ein *loss of heterozygosity* auf folgenden Chromosomenabschnitten beobachtet: Chromosom 11q13 [11, 12]; Chromosom 3p25-26 [18] und Chromosom 17p [19]. Noch seltener ereignen sich K-ras Onkogen-

Aktivierung bzw. Tumorsuppressorgen-Inaktivierung [20]. Das mutierte MEN-1 Gen (11q23), das zur multipel auftretenden Form der PET führt, ist in ganz seltenen Fällen auf eine sporadische Mutation des Gens zurückzuführen. Bei der viel häufigeren hereditären Form ist für die Klinik bedeutend, dass die Penetranz der MEN-1 Erkrankung durch das mutierte MEN-1 Gen bei annähernd 100 % liegt [14, 21].

Tabelle 1. Endokriner Pankreas: Aufbau und Erkrankung

Zelltyp (%-Anteil)	Hormon	klinisches Syndrom	PET**
B-Zelle (80 %)	Insulin	hypoglykämischer Hyperinsulinismus	Insulinom
A-Zelle (10-20 %)	Glukagon	Erythema necrolyticans migrans	Glukagonom
D-Zelle (5-7 %)	Somatostatin	Diabetes mellitus; Cholelithiasis; Steatorrhoe	Somatostatinom
D1-Zelle	VIP*	WDHA-Syndrom (Verner-Morrison-Syndrom watery diarrhoea, hypokaliaemia, achlorhydria)	VIPom
G-Zelle	Gastrin	Zollinger-Ellison-Syndrom (ZES)	Gastrinom
F-Zelle	pankreatisches Polypeptid	---	Ppom

* vasoaktives intestinales Polypeptid

* *pancreatic endocrine tumour*

1.4. Klassifikation neuroendokriner Tumore

1907 prägte Oberndorfer den Begriff des „Karzinoids“ und wollte damit verdeutlichen, dass es im Darm seltene karzinomähnliche Tumoren gibt, die sich weniger aggressiv als die gewöhnlichen Karzinome verhalten [10]. 1952 von Erspauer bzw. 1954 von Lembeck stammt die Erkenntnis, dass Karzinoide Serotonin enthalten [22]. Thorson beschrieb 1954 erstmalig das „Karzinoidsyndrom“ [9]. Nachdem Karzinoide nicht nur im Dünndarm, sondern auch in anderen Bereichen beschrieben worden waren, unterteilten 1963 Williams und Sandler die Karzinoide nach embryogenetischen Gesichtspunkten in Vorder- (*foregut*), Mittel- (*midgut*) und Enddarm (*hindgut*) [23]. 1980 unterteilte die WHO-Klassifikation die Karzinoide in enterochromaffine, Gastrin- und nicht näher spezifizierte Karzinoide. Nach einem weiteren Klassifikationsansatz von Capella et al. 1995 [24], wurde bei der WHO-Klassifikation im Jahr 2000 der neutrale Begriff des neuroendokrinen Tumors und

des neuroendokrinen Karzinoms verwendet [25]. Um Missverständnissen vorzubeugen wurde der Begriff des Karzinoids nicht vollständig aufgegeben, sondern bei den gastroenteralen neuroendokrinen Tumoren (NET) synonym zum hoch differenzierten neuroendokrinen Tumor verwendet. Der Begriff des malignen Karzinoids wurde synonym für das hoch differenzierte neuroendokrine Karzinom eingesetzt. Im Einzelnen wurde zwischen dem hoch differenzierten neuroendokrinen Tumor (wd NET – „*well differentiated neuroendocrine tumor*“), dem hoch differenzierten neuroendokrinen Karzinom (wd NEC – „*well differentiated neuroendocrine carcinoma*“) und dem niedrig differenzierten neuroendokrinen Karzinom (pd NEC – „*poorly differentiated neuroendocrine carcinoma*“) unterschieden. Beim hoch differenzierten neuroendokrinen Tumor wurde ein benignes Verhalten (wd NET) von einer fraglichen Dignität getrennt (wd NET ub – „*well differentiated neuroendocrine tumor with unknown behaviour*“). Das hoch differenzierte neuroendokrine Karzinom (wd NEC) wurde mit einem niedrigmalignen Verhalten beschrieben, während das niedrig differenzierte neuroendokrine Karzinom (pd NEC) eine hohe Malignität aufweist. In einem zweiten Schritt wurde 2004 nach Lokalisation und Biologie der Tumoren spezifiziert und um biologische Kriterien erweitert, um auch der Prognose Rechnung zu tragen [26]. Hinsichtlich der Tumorlokalisation wurde zwischen Magen, Duodenum (und proximales Jejunum), Ileum (einschließlich distales Jejunum), Appendix, Kolon-Rektum und Pankreas unterschieden.

1.4.1. WHO Klassifikation (2004)

Neuroendokrine Tumore des Pankreas (PET) lassen sich nach der WHO-Klassifikation von 2004 in drei Gruppen unterteilen (siehe Tabelle 2): hoch differenzierter neuroendokriner Tumor (1 A/B), hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom (2) und niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom (3). Für die Einteilung werden histologische Kriterien wie Tumorgröße, Angioinvasion und Zelldifferenzierung herangezogen. Weiterhin werden der Nachweis von Metastasen, das Vorhandensein eines hormonellen Syndroms, der Peptidphänotyp und insbesondere auch die Proliferationsaktivität, gemessen am Prozentsatz Ki-67 (Antigen)/ Mib-1 (Antikörper) positiver Tumorzellen, berücksichtigt. Mit Hilfe dieser Kriterien ist eine klinisch relevante prognostische Einordnung der PET möglich. In

der Gruppe der hoch differenzierten neuroendokrinen Tumore können PET mit benignem Verhalten von PET mit unklarem Verhalten (wd PET ub) unterschieden werden. Diese Einteilung hängt von der Existenz folgender Malignitätszeichen bei fehlender Metastasierung ab: Tumorgöße (>2 cm), Angioinvasion, Mitoseverhalten (>2 / HPF) und Ki-67/ MiB-1 Proliferationsindex (> 2 %). Gemeinsam machen wd PET und wd PET ub einen Anteil von 80-90 % der Insulinome aus [27].

Tabelle 2. WHO-Klassifikation PET von 2004

1. hoch differenzierter neuroendokriner Tumor (A: wd PET | B: wd PET ub)

- A** *benignes Verhalten: auf Pankreas begrenzt; nicht-angioinvasiv; < 2cm;*
 ≤ 2 Mitosen/ 10 HPF, < 2 % Ki-67 positiver Zellen
- funktionell aktiv: Insulinom
 - funktionell inaktiv
- B** *unklares Verhalten: auf Pankreas begrenzt; angioinvasiv; > 2cm;*
 > 2 Mitosen/ 10 HPF, > 2 % Ki-67 positiver Zellen
- funktionell aktiv: Gastrinom; Insulinom; VIPom; Glukagonom; Somatostatinom oder ektopisch hormonell-induziertes Syndrom *
 - funktionell inaktiv

2. hoch differenziertes neuroendokrines Karzinom (wd PEC)

- niedrig malignes Verhalten: lokale Invasion und/oder Metastasen*
- funktionell aktiv: Gastrinom; Insulinom; VIPom; Glukagonom; Somatostatinom oder ektopisch hormonell-induziertes Syndrom *
 - funktionell inaktiv

3. niedrig differenziertes neuroendokrines Karzinom (pd PEC)

hoch malignes Verhalten

HPF	<i>high-power fields</i>
*	<i>z. B. Cushing-Syndrom bei ektooper ACTH-Produktion; Akromegalie; Hypercalcämie</i>
wd PET	<i>well differentiated pancreatic endocrine tumour</i>
wd PET ub	<i>well differentiated pancreatic endocrine tumour with unknown behaviour</i>
wd PEC	<i>well differentiated pancreatic endocrine carcinoma</i>
pd PEC	<i>poorly differentiated pancreatic endocrine carcinoma</i>

1.4.2. TNM Klassifikation (2006/2007)

Aufgrund der Heterogenität der PET wurde im Jahr 2006 ein Entwurf zur TNM-Klassifikation erstellt – für Organsysteme, die dem Vorderdarm angehören [28]. Im Jahr 2007 wurde die bestehende TNM-Klassifikation um einen Entwurf für den Mittel- und Enddarm ergänzt [29]. Als Grundlage dient in beiden Fällen die etablierte WHO-Klassifikation in ihrer überarbeiteten Version von 2004. Das Ziel ist eine weltweite Einheitlichkeit und Vergleichbarkeit dieser neuroendokrinen Tumore zu schaffen. Die Umsetzbarkeit und Aussagekraft dieser TNM-Klassifikation wird zurzeit in vielen laufenden Studien untersucht.

Für den Pankreas werden hierbei Tumorgöße, Organbefall, Lymphknotenstatus, Fernmetastasierung und Differenzierungsgrad zur Einteilung herangezogen. Hingegen finden die funktionelle Aktivität, die Hauptzellbestandteile und die genetische Herkunft der Tumore keine Berücksichtigung. Beim *T-Status* spielt typischerweise die Größe des Primärtumors und die Primärtumorausbreitung im Pankreas eine Rolle. Die Größe des T1-Status entspricht der Vorgabe der WHO für den hochdifferenzierten neuroendokrinen Tumor des Pankreas mit benignem Verhalten (wd PET). Der T2-Status orientiert sich am hochdifferenzierten neuroendokrinen Tumor des Pankreas mit unklarem Verhalten (wd PET ub) der WHO-Klassifikation. Die Obergrenze von 4cm muss hierbei noch als Abgrenzung zum invasiveren T3-Status validiert werden. Der *N-Status* richtet sich nach dem metastatischen Befall der regionalen Lymphknoten. Dabei bedeutet zwar eine vorliegende Lymphknotenmetastasierung grundsätzlich eine schlechtere Prognose für den Patienten, aber bislang ist nicht bekannt, ob ein Befall mehrerer Lymphknoten gegenüber einer einzelnen Lymphknotenmetastase die Prognose signifikant verschlechtert. Eine mögliche Fernmetastasierung wird durch den *M-Status* berücksichtigt.

Anhand des *TNM-Status* lässt sich die Tumorerkrankung in vier Krankheitsstadien einteilen (*Staging*): Dem Stadium I entspricht ein T1-Status ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen (T1 N0 M0). Das Stadium II kennzeichnen Tumore, die entweder größer sind als 2 cm (T2/T3) oder ein invasiveres Verhalten aufweisen (T3), ohne Lymphknoten- und Fernmetastasen (T2/3 N0 M0). Das Stadium III mit einer erhöhten

Malignität zeigt ein Tumorwachstum über die Organgrenzen hinaus mit Infiltration benachbarter Strukturen / Organe oder weist bereits regionale Lymphknotenmetastasen auf (T4 N0 M0 oder T1-4 N1 M0). Dem Stadium IV liegt immer eine Fernmetastasierung zugrunde (T1-4 N0/1 M1).

Tabelle 3. TNM Klassifikation PET von 2006 [28]

TNM			
T – Primärtumor			
TX	Primärtumor nicht beurteilbar		
T0	Keine Anzeichen eines Primärtumors		
T1	Tumor auf Pankreas beschränkt; Tumorgöße: < 2 cm		
T2	Tumor auf Pankreas beschränkt; Tumorgöße: 2 – 4 cm		
T3	Tumor auf Pankreas beschränkt; Tumorgöße: > 4 cm oder Tumor infiltriert Duodenum und/oder biliäre Ausführungsgänge		
T4	Tumor infiltriert umliegende Organe (Magen, Milz, Kolon, Nebenniere) oder die Wand größerer Gefäße (Truncus coeliacus oder Arteria mesenterica superior)		
(m)	Bei multiplen Tumoren wird jedem T-Status ein „m“ hinzugefügt		
N – regionale Lymphknoten			
NX	Regionaler Lymphknotenstatus nicht beurteilbar		
N0	Kein Tumorbefall regionaler Lymphknoten		
N1	Regionale Lymphknotenmetastase		
M – Fernmetastasen			
MX	Fernmetastasierung nicht beurteilbar		
M0	Keine Fernmetastase		
M1	Fernmetastase		
Stage¹			
Stadium I	T1	N0	M0
Stadium IIa	T2	N0	M0
IIb	T3	N0	M0
Stadium IIIa	T4	N0	M0
IIIb	Alle T	N1	M0
Stadium IV	Alle T	Alle N	M1
Grade²			
G1	Anzahl der Mitosen/ 10 HPF ^a	Ki-67 Index (%) ^b	
	< 2	≤ 2	
G2	2 – 20	3 – 20	
G3	> 20	> 20	

1 *Staging* = Einteilung in Krankheitsstadien

2 *Grading* = Einteilung in Differenzierungsgrade

a 10 HPF: *high power field* = 2 mm²; mindestens 40 HPF beurteilt (bei 40-facher Vergrößerung) in Bereichen höchster mitotischer Dichte

b Angabe in Prozent (%) bei 2000 Tumorzellen in Bereichen mit stärkster Reaktion auf MIB1-Antikörper

Als ergänzendes Kriterium wird eine Einteilung in drei Differenzierungsgrade (*Grading*) vorgenommen. Diese erfolgt anhand des Mitoseverhaltens (Anzahl der Mitosen/ 10 HPF) und des Proliferationsindex (Ki-67 Index in %). G1 und G2 sind eher den benignen, gut differenzierten Tumoren zuzuordnen und zeichnen sich durch eine diffuse, starke Expression für Chromogranin A und Synaptophysin aus. Während ein G3 Grading in der Regel auf ein Karzinom hindeutet, zudem öfters Nekrosen durch hohe Teilungsraten aufweist und sich bei gleichbleibend starker Expression für Synaptophysin durch eine reduzierte Chromogranin A Expression auszeichnet [28].

1.5. Insulinome des Pankreas

1.5.1. Ätiologie / Epidemiologie

Die häufigsten PET sind insulinproduzierende Tumore (ca. 90 %), die von den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas ihren Ausgang nehmen [30, 31]. Somit stellen sie eine wichtige Tumorentität des Pankreas dar, die in den meisten Fällen als solitärer, gutartiger Tumor von 1 bis 2 cm Größe vorkommen [31]. In jeweils 10 % der Fälle sind Insulinome maligne entartet, treten multipel oder MEN-1 assoziiert auf. Daher spricht man in diesem Zusammenhang oft von sogenannten „10%-Tumoren“ [16]. Die höchste Neuerkrankungsrate befindet sich während des 5. Lebensjahrzehnts. Jährlich sind 1-5 neue Fälle auf 1 Million zu verzeichnen [32]. Davon sind statistisch gesehen Frauen doppelt so häufig betroffen wie Männer. Insulinome werden typischerweise durch einen gut zu diagnostizierenden hypoglykämischen Hyperinsulinismus auffällig, aber nicht selten erst relativ spät diagnostiziert. Auch gilt die NET-typische, nicht immer eindeutig zu treffende Dignitätseinteilung.

1.5.2. Klinik

Die Klinik beim Insulinom manifestiert sich durch eine Symptomentrias aus wiederholten Hypoglykämien (Blutzucker < 50 mg/dl) und den damit assoziierten neurologischen und autonomen Symptomen, bei rasch einsetzender

Symptombesserung bei Glukosezufuhr („Whipple-Trias“) [33]. Die Symptome treten hierbei wesentlich durch den Glukosemangel im ZNS und dem gegenregulatorisch aktivierten Sympathikus in Erscheinung. Während die Hirnrinde sehr sensibel auf Glukosemangel reagiert, bleiben die Stammhirnfunktionen, wie z.B. die Atmungsregulation durch das Atemzentrum, am längsten erhalten. Die Hypoglykämie kann durch zahlreiche Beschwerden klinisch auffällig werden, die besonders in den Morgenstunden gehäuft auftreten. Diese reichen von Herzklopfen, Blässe der Haut und kaltem Schweiß zu Übelkeit, Tremor und Bewegungsunsicherheit (vegetativ-adrenerge Zeichen). Weitere typische Symptome sind Doppelbilder, Koordinationsstörungen und tonisch-klonische Anfälle mit Streckkrämpfen und anschließendem Koma (neuroglukopen-neurologische Zeichen) und Depressionen und Psychosen (neuroglukopen-psychische Zeichen). Oft sind diese Symptome begleitet von einer Gewichtszunahme, die in dem Versuch des Patienten begründet liegt, seine Essgewohnheiten zur Abwendung solcher hypoglykämischer Phasen anzupassen.

Ursachen für eine Hypoglykämie sind vielfältig. Die häufigste Form ist die medikamenteninduzierte Hypoglykämie, die insbesondere im Rahmen einer Diabetes mellitus Erkrankung und ihrer Behandlung eine Rolle spielt. Sie kann durch Insulinüberdosierung (möglicherweise auch in suizidaler Absicht) oder durch Einnahme von oralen Antidiabetikern bei gleichzeitiger Nahrungskarenz entstehen. Reaktive Hypoglykämien ohne Hyperinsulinismus sind als Folge eines Alkoholabusus, genetischer Enzymdefekte oder einer gestörten Glukoneogenese der Leber zu sehen. Reaktive Hypoglykämien mit Hyperinsulinismus kommen entweder in einer hereditären, leucininduzierten Form vor oder sind bedingt durch eine partielle oder totale Gastrektomie. Seltener hingegen sind Fastenhypoglykämien ohne Hyperinsulinismus, die beim Morbus Addison, Glukagenosen Typ I, II, IV, hereditären Fruktose-1,6-Disphosphatase-Mangel oder McQuarrie-Zetterstroem-Syndrom (kindlich-idiopathische Hypoglykämie) auftreten können. Wenn eine Hypoglykämie aufgrund einer inadäquat erhöhten, endogenen Insulin-(Proinsulin) Sekretion besteht, spricht man von einem organischen Hyperinsulinismus.

1.5.3. Diagnostik

Neben der Whipple-Trias ist die entscheidende Besonderheit des organischen Hyperinsulinismus, die vom Regelkreis unabhängige, endogene Sekretion von Insulin. Dies lässt eine Unterscheidung von anderen Hypoglykämie-Formen zu. Hierbei sind der Hunger- bzw. Fastentest und der Insulin-Suppressionstest als Nachweisverfahren geeignet. Weitere Stimulationstests wie z.B. der Tolbutamid-Test sind mittlerweile obsolet und verlassen worden. Der invasive intraarterielle Calcium-Stimulationstest (Imamura-Test) kann zwar bei der Diagnose eines organischen Hyperinsulinismus nicht weiterhelfen [34], ist aber nützlich als Lokalisationstest. Dies ist deshalb von großer Bedeutung, weil die Mehrzahl der insulinproduzierenden Tumore nur 3 – 10 mm groß und ihre Detektion deshalb äußerst schwierig ist [35, 36]. In welchem Ausmaß präoperative Diagnostik betrieben werden muss und welche bildgebenden Verfahren präoperativ notwendig und sinnvoll erscheinen ist bislang ein vieldiskutiertes Thema. Der Endosonographie kommt in diesem Zusammenhang eindeutig ein großer Stellenwert zu. Sie ist besonders im Hinblick auf die präoperative Tumorlokalisation im Organ hilfreich. Gemeinsam mit einer CT und Ultraschalluntersuchung des Abdomens als orientierende Maßnahme zum Ausschluss vorhandener Metastasen wird eine Sensivität von ca. 70 – 80 % erreicht. Mit intraoperativem Ultraschall des Pankreas (IOUS) lässt sich die Tumordetektionsrate sogar noch erhöhen. Als weitere diagnostische Methode sei die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie (SRS) erwähnt. Sie hat eine Bedeutung als ergänzende Untersuchungsmethode zur Lokalisation von Primärtumor und Metastasen bei Neuroendokrinen Tumoren des gastro-entero-pankreatischen Systems (NET-GEP). Beim Insulinom ist aufgrund der geringen Expression des Somatostatin-Rezeptors vom Subtyp 2 und 5 die Sensitivität mit lediglich 10-50% angegeben [37].

1.5.4. Therapie

Die Diagnose eines Insulinoms stellt in der Regel eine OP-Indikation dar. Mit einer Operation besteht die Möglichkeit einer kurativen Resektion und der damit verbundenen Symptombeseitigung. Bei einem gutartigen, solitären Insulinom ist das durch eine einfache Enukleation des Tumors zu erreichen und bedeutet meist eine vollständige Remission der Erkrankung. Hierbei ist bei kapselnah gelegenen Tumoren eine Schonung des restlichen Pankreasgewebes möglich. Tief im Parenchym lokalisierte Tumore erfordern auch weiterreichende OP-Maßnahmen wie Pankreasschwanzresektion, Pankreaslinksresektion und Pankreassegmentresektion bis hin zur Whipple-OP. Die Therapie maligner Insulinome ist äußerst schwierig. Die therapeutische Bandbreite reicht von chirurgischen Maßnahmen bis hin zu adjuvanten Therapiekonzepten. Auch wenn mit keiner Heilung zu rechnen ist, kann eine radikale Chirurgie, angefangen bei Pankreasresektion über Ausräumung der Lymphknotenstationen und Metastasen Chirurgie bis hin zur bestmöglichen Tumorverkleinerung bei inoperablen Tumoren, notwendig sein, um die Symptome beherrschen zu können. Auch mehrfache Re-Operationen können daher durchaus gerechtfertigt sein. Gefordert sind neue Therapiekonzepte, die maligne Insulinome über die chirurgischen Maßnahmen hinaus behandelbar machen. Es existieren bereits adjuvante Therapien u.a. mit Streptozotocin und Doxorubicin [38, 39]. Eine Behandlung mit Somatostatin-Analoga und Interferon- α ist prinzipiell auch als symptomatische, antiproliferative Therapie denkbar. Darüber hinaus gibt es mittlerweile Phase-III Studien mit sogenannten „modernen Targettherapien“, beispielsweise Sunitinib und Everolimus [40].

1.5.5. Einteilung nach der WHO-Klassifikation (2004)

1.5.5.1. Gut differenzierte, benigne Insulinome (wd PET)

Die häufigste Form des organischen Hyperinsulinismus stellen die gut differenzierten, benignen Insulinome dar. Sie kommen bei über 70 % der Patienten vor. Charakteristisch für diese Tumore sind ein verdrängendes Wachstum bei fehlender Gewebs- und Angioinvasion und eine bindegewebige Tumorkapsel, die den Tumor zum umliegenden Gewebe hin abgrenzt. Meistens sind wd PET sehr kleine Tumore, die eine Größe von 2 cm nicht überschreiten. Sie sind trotz ihrer geringen Größe von teilweise unter 1 cm in der Lage Zustände schwerer Hypoglykämien hervorzurufen, weshalb eine Korrelation von Tumorgöße zum Schweregrad der Klinik nicht möglich ist.

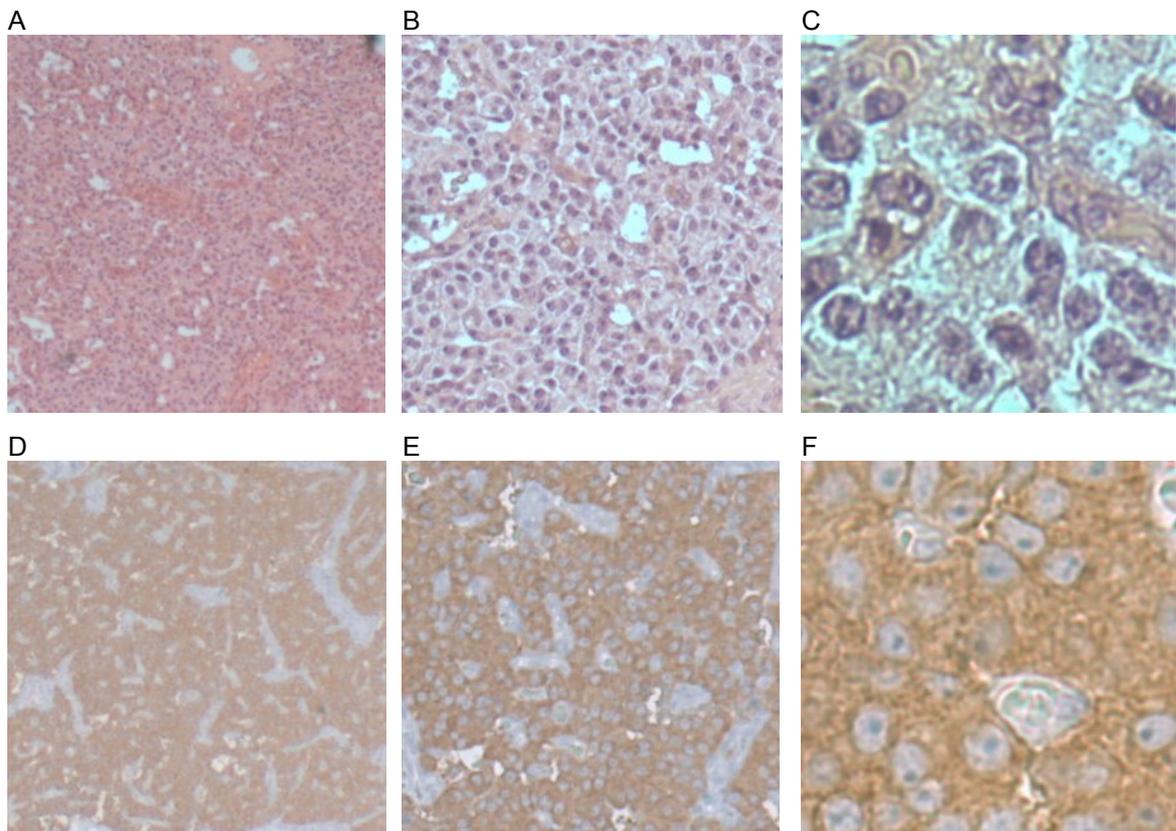


Abbildung 1. Pankreas, benignes Insulinom (WHO 1A)

Gut differenzierte, geordnet trabekulär wachsende Insulinomzellen als H.E. Färbung in (A) 4facher, (B) 10facher und (C) 40facher Vergrößerung und als Synaptophysin Färbung in (D) 4facher, (E) 10facher und (F) 40facher Vergrößerung

1.5.2.2. Gut differenzierte Insulinome mit unklarem Verhalten (wd PET ub)

In über 10 % der Fälle treten gut differenzierte Insulinome auf, deren klinisches Verhalten allein nach histopathologischen Kriterien nicht beurteilbar ist. Sie stellen ein Intermediärstadium zwischen benignem Tumor und malignem Karzinom dar. Es liegen keine Metastasen vor, jedoch sind eindeutige lokale Malignitätszeichen nachweisbar. Dies kann eine Tumorgroße > 2 cm, eine Angioinvasion, eine Infiltration des intakten Pankreasparenchyms durch Tumorgewebe oder ein deutlich erhöhter Proliferationsindex sein. Ob solche Zwischenformen ein Frühstadium eines Karzinoms darstellen, ist fraglich. Derzeit lässt sich nur anhand des zeitlichen Follow-Ups mit Gewissheit sagen, wie hoch die Gefahr einer malignen Entartung solcher Tumore ist.

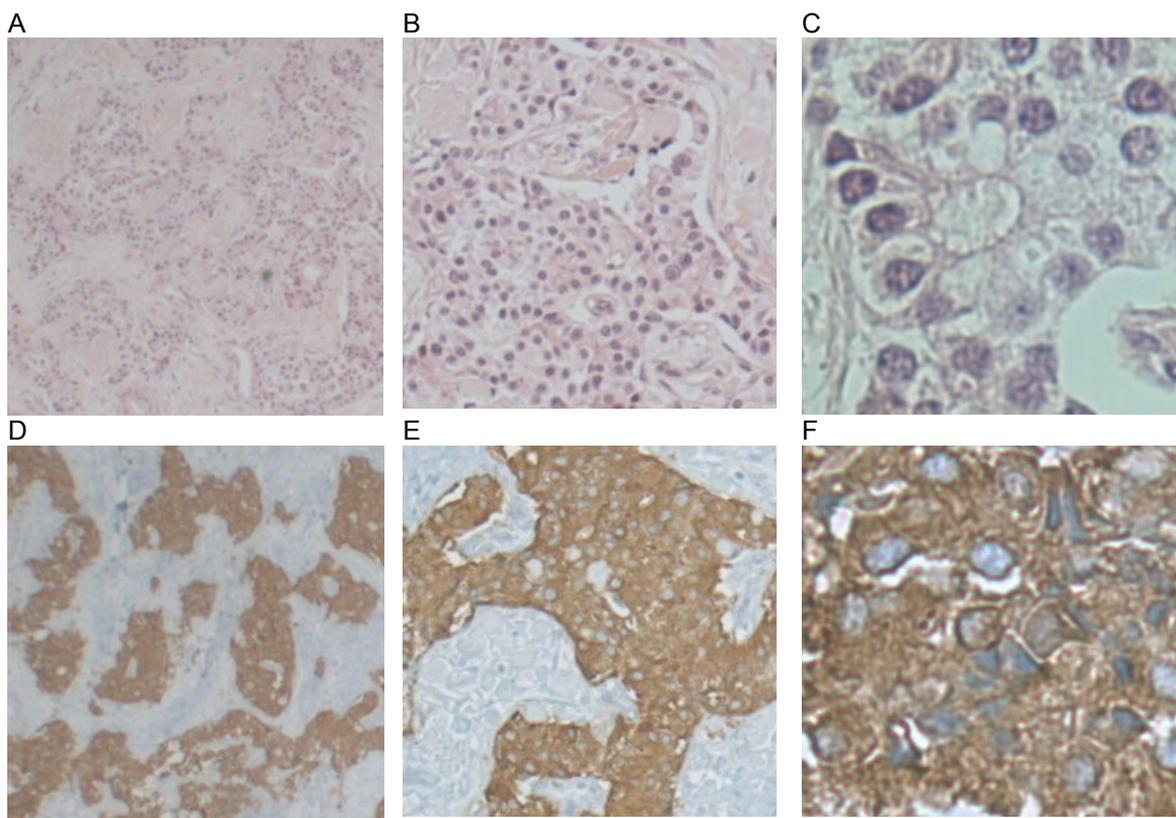


Abbildung 2. Pankreas, Insulinom mit unklarem Verhalten (WHO 1B)

Gut differenzierte, invasiv in Stomagewebe wachsende Insulinomzellen als H.E. Färbung in (A) 4facher, (B) 10facher und (C) 40facher Vergrößerung und als Synaptophysin Färbung in (D) 4facher, (E) 10facher und (F) 40facher Vergrößerung

1.5.5.3. Maligne Insulinome (wd PEC; pd PEC)

Maligne Insulinome sind zu einem Anteil von ca. 10 % bei Patienten mit organischem Hyperinsulinismus vertreten. Sie werden in gut differenzierte maligne Insulinome (wd PEC) und seltenere schlecht differenzierte maligne Insulinome (pd PEC) unterteilt. Histomorphologisch sind sie kaum von wd PET ub zu unterscheiden. Typischerweise kommen infiltrierendes Wachstum, Angioinvasion und ein hoher Proliferationsindex (>2 % Ki-67 positiver Zellen) vor. Im Unterschied zu wd PET ub ist ein Tumorwachstum über die Organgrenze hinaus zu verzeichnen. Metastasen sind nachweisbar, die ein schlechteres Outcome für die Patienten bedeuten. Sie kommen in den Lymphknoten der zugehörigen Lymphabflusswege und typischerweise in der Leber vor. Selten werden auch Knochenmetastasen beobachtet. Die Patienten versterben dann an schwersten, therapeutisch nicht mehr zu beeinflussenden hypoglykämischen Zuständen.

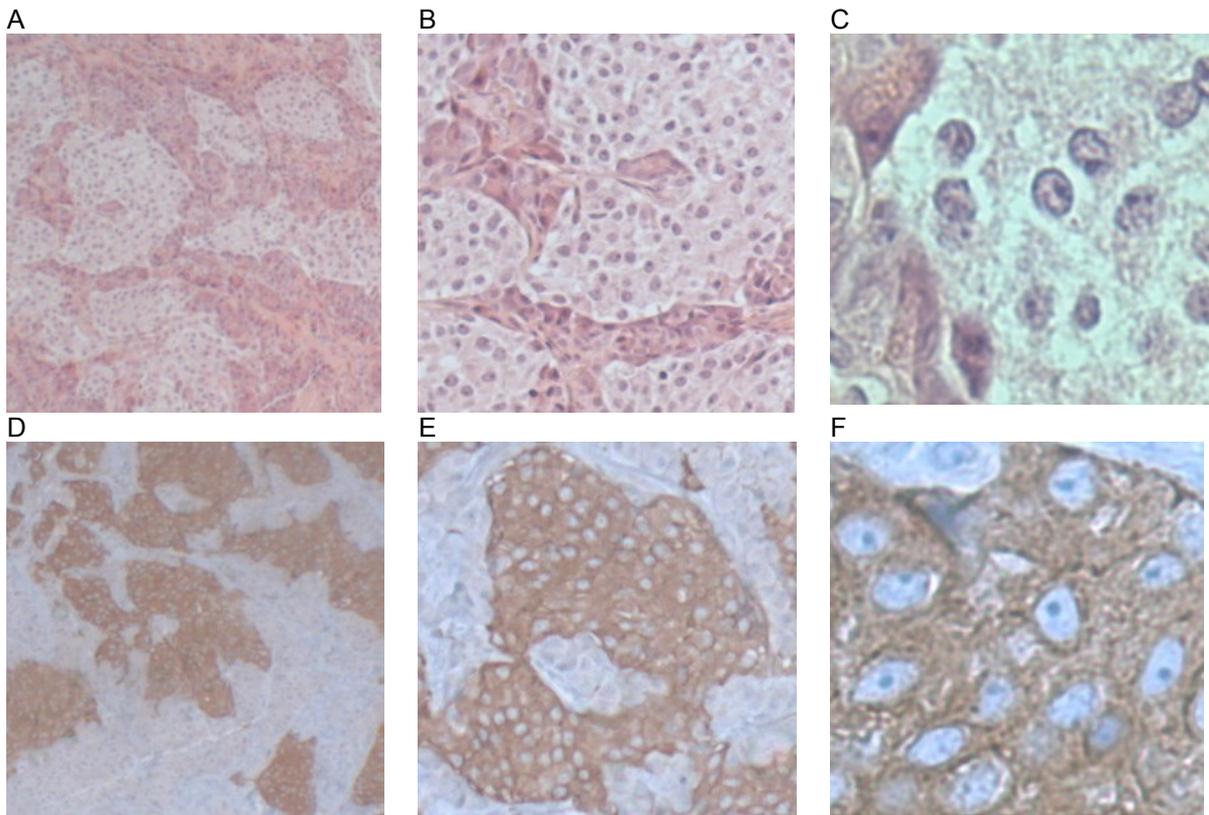


Abbildung 3a. Malignes Insulinom (WHO 2): Primarius, Pankreas

Mäßig differenzierte, invasiv in exokrines Pankreasgewebe wachsende Karzinomzellen als H.E. Färbung in (A) 4facher, (B) 10facher und (C) 40facher Vergrößerung und als Synaptophysin Färbung in (D) 4facher, (E) 10facher und (F) 40facher Vergrößerung

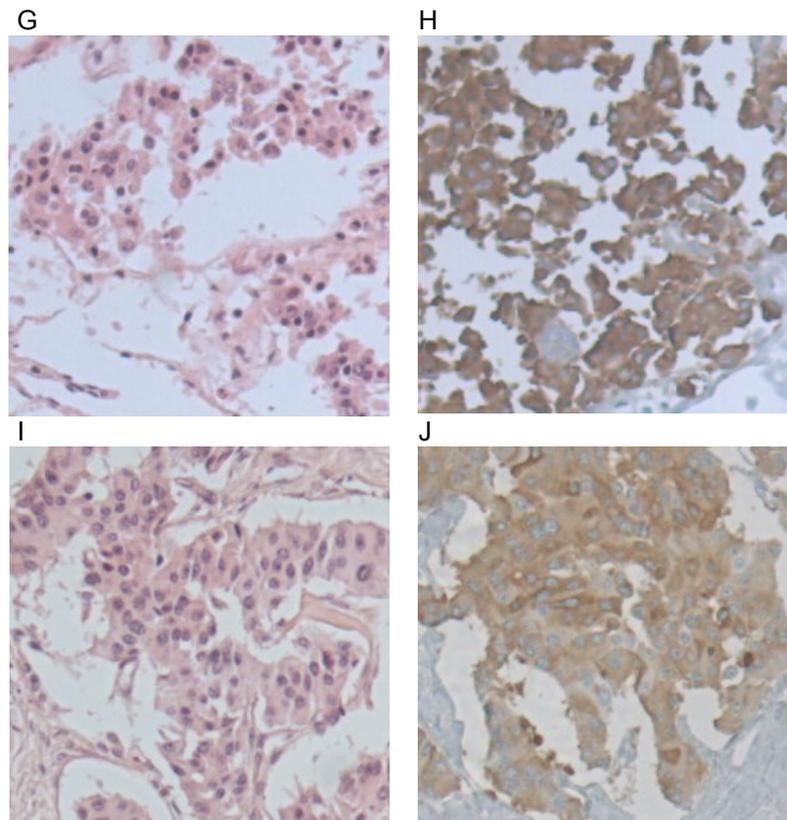


Abbildung 3b. Malignes Insulinom (WHO 2): Metastasen, Lymphknoten und Leber
Mäßig differenzierte Karzinomzellverbände in 10facher Vergrößerung im Lymphknoten als H.E. Färbung (G) und als Synaptophysin Färbung (H); in der Leber als H.E. Färbung (I) und als Synaptophysin Färbung (J)

1.6. Differentialdiagnosen: Nesidioblastose, Pankreasadenomatose, Insulinomatose

Nesidioblastosen des Pankreas stellen eine Sonderform des organischen Hyperinsulinismus dar. Sie ist bei Neugeborenen als häufige Ursache einer persistierenden hyperinsulinämischen Hypoglykämie (PHH) beschrieben. Der entscheidende Unterschied zum solitären Insulinom, der wiederum beim Erwachsenen die häufigste Ursache einer PHH darstellt, ist die Tatsache, dass die Fehlfunktion der β -Zelle in einer diffusen β -Zell Hypertrophie besteht. Sie ist somit klar von der β -Zell Hyperplasie des Insulinoms abzugrenzen [41-44]. Präoperativ lässt sich dieser Unterschied jedoch nicht zuverlässig diagnostizieren. Außerdem unterscheidet man bei der Nesidioblastose eine kindliche, diffuse Form von einer adulten, fokal begrenzten Form, für die im Gegensatz zur kindlichen Nesidioblastose keine genetischen Veränderungen bekannt sind [44-50].

Pankreasadenomatosen als weitere Manifestationsform des organischen Hyperinsulinismus kommen bei ca. 10 % der Patienten vor. In der Regel treten diese im Rahmen einer multiplen endokrinen Neoplasie Typ 1 (MEN-1) auf. Seit kurzem sind auch MEN-1 unabhängige Mikroadenomatosen bekannt [51-53]. Charakteristisch sind viele kleine endokrine Tumore (<5 mm), die viele unterschiedliche Hormone (Insulin, Glukagon, pankreatisches Polypeptid, Somatostatin) sezernieren können und dennoch als asymptomatisch angesehen werden. Typischerweise sind zusätzlich ein bis zwei Makrotumore ausgebildet, die für die klinischen Symptome verantwortlich sind [51, 53-56]. Diese Makrotumore sind funktionell aktiv und können ebenso wie die Mikrotumore verschiedene Hormone exprimieren.

Insulinomatosen sind erst kürzlich beschrieben und weisen multizentrische Läsionen ohne Allelverlust am MEN1-Genlokus auf [57]. Eine Besonderheit dieser Manifestationsform ist, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt und im zeitlichen Verlauf aus verschiedenen Vorläuferzellen Makrotumore, Mikrotumore und kleine proliferierende Zellverbände (IMECCs – *insulin-expressing monohormonal endocrine cell clusters*) entstehen, die ausschließlich Insulin produzieren. Patienten mit einer Insulinomatose haben eine hohe Rezidivneigung bei geringem malignem Entartungsrisiko.

Bei der Behandlung von diffus verteilten Nesidioblastosen, MEN-1 assoziierten Adenomatosen und Insulinomatosen des Pankreas ist eine chirurgische Intervention sehr schwierig, da besonders die Frage, wie viel Pankreasgewebe reseziert werden muss, ohne eine Pankreasinsuffizienz zu riskieren, nicht eindeutig zu klären ist. Beim MEN-1 Syndrom und der Insulinomatose bietet außerdem auch eine großzügige Pankreasteilresektion aufgrund hoher Rezidivneigung nur einen begrenzten Schutz. An dieser Stelle kann zumindest eine Pankreastransplantation diskutiert werden.

1.7. Prognosemarker neuroendokriner Tumore

1.7.1. Etablierte Prognosemarker neuroendokriner Tumore: Ki-67 / MiB-1

Ki-67/ MiB-1 ist ein bekannter Proliferationsmarker. Das nukleäre Antigen Ki-67, welches im nahezu gesamten Zellzyklus expremiert wird (G1-, S- und G2-Phase), dient dabei als Angriffspunkt. Der monoklonale Antikörper MiB-1, der gegen das Ki-67-Antigen gerichtet ist, kann daher eine Aussage über die Proliferationsaktivität treffen [52]. In zahlreichen Studien ist zudem der Zusammenhang der Proliferationsaktivität neuroendokriner Tumore mit der Prognose der Patienten beschrieben. Eine hohe Proliferationsaktivität geht hierbei mit einer schlechten, klinisch relevanten Prognose einher [52, 58-61]. Ab einem bestimmten Wert MiB-1 positiver Zellen besteht ein signifikant erhöhtes Risiko, dass der Tumor maligne entartet und sich die Prognose des Patienten dadurch signifikant verschlechtert. Durch die WHO ist ein Schwellenwert von 2 % beschrieben, während sich in einigen Publikationen Angaben bis zu 5 % finden lassen [58, 62-64].

1.7.2 Detektion neuer Prognosemarker beim Insulinom: Histone

1.7.2.1. Grundlagen

In menschlichen und anderen eukaryoten Zellen liegt die DNA (=Desoxyribonukleinsäure) in einer kompakten Form, als Chromatin, vor. Spezielle Proteine, die Histone, tragen zu dieser Form bei, indem sie die DNA von ihrer theoretischen Länge von ca. 1 m auf eine Größe von durchschnittlich 10 µm reduzieren. Hierbei bildet ein Histonoktamer aus jeweils zwei H2A-, H2B-, H3- und H4-Histonen zusammen mit 146 Basenpaaren das sogenannte Nukleosom [65]. Die dadurch komprimierte DNA lässt sich wiederum grob in Euchromatin und Heterochromatin aufteilen. Dem Euchromatin werden Bereiche der DNA zugewiesen, die nur relativ gering verpackt sind und daher eine hohe Aktivität aufweisen. Zudem befindet sich ein Großteil der Gene in diesen Abschnitten, während in Bereichen des Heterochromatins viele repetitive Sequenzen zu finden sind. Das Heterochromatin zeichnet sich dadurch aus, dass die DNA mit den Histonen dichte Strukturen bildet und in ihrer Aktivität deutlich reduziert ist. Histone bieten folglich neben ihrer Eigenschaft als Strukturprotein zusätzlich einen Ansatz zur DNA-Regulation. Durch

bestimmte Modifikationen an Histonen lassen sich alle metabolischen Prozesse auf DNA-Ebene – Replikation, Transkription und Reparaturmechanismen – beeinflussen [66]. Bei Modifikationen an Histonen handelt es sich um Prozesse, die vor einer unmittelbaren Genregulation stattfinden. In diesem Zusammenhang ist der Begriff der Epigenetik geprägt worden. Die Epigenetik beschreibt vererbbare Informationen, die außerhalb der DNA-Basenpaar-Codierung vorhanden sind und die Einfluss auf die Genexpression nehmen können [67]. Darunter fallen DNA-Methylierungsstatus, RNA-assoziierte Abschaltung von Genen und der „*histone code*“ – als „*histone code*“ wird die Information durch die Variation der Histone bezeichnet, die durch verschiedene Modifikationen an den Histonen entsteht [68]. Diesen epigenetischen Prozessen schreibt man mittlerweile eine zentrale Rolle in der Karzinogenese zu.

1.7.2.2. *Regulationsmechanismen*

Es gibt vier verschiedene Möglichkeiten den Chromatinstatus und die damit verbundene Genexpressionsaktivität zu verändern. Erstens können Histone durch Histonvarianten ausgetauscht werden [69]. Zweitens bewirkt eine Methylierung am C5-Ende der DNA eine langfristige Ruhiglegung von Genabschnitten [70]. Drittens bewirken post-translationale kovalente Veränderungen an Histonen eine Strukturänderung, die weitere enzymatische Prozesse an der DNA erschwert oder vereinfacht [71]. Viertens erreichen ATP-abhängige nicht-kovalente Veränderungen am Histon-DNA-Komplex durch Drehen und Verschieben von Nukleosomen entweder ein Offenlegen oder ein Versperren lokaler DNA-Abschnitte für Enzymkomplexe bzw. andere Proteine [72]. Dies kann je nach Enzymkomplex zu einer Aktivierung der Transkription oder aber zur Einleitung der Heterochromatisierung führen. Die RNA-vermittelte Geninaktivierung als dritter bekannter epigenetischer Prozess, neben DNA-Methylierung und Histonmodifikation, ist bisher lediglich bei Insekten, Pflanzen und Pilzen nachgewiesen, nicht jedoch bei den Wirbeltieren wie z. B. dem Menschen. Die DNA-Methylierung spielt nur bei komplexeren Genomen höherer Organismen eine Rolle. Histonmodifikationen hingegen gelten als universelle regulatorische Mechanismen eukaryoter Zellen [73]. Im Allgemeinen stellen Histonmodifikationen ein frühes Ereignis dar, das oft vor einer DNA-Methylierung stattfindet. Als kovalente Histonveränderungen sind

Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung, Ubiquitierung und SUMOylierung bekannt. Der Acetylierungsstatus stellt einen leicht reversiblen Zustand dar, der durch bestimmte Multiproteinkomplexe bestimmt wird. Histonacetyltransferasen (HAT) katalysieren die Acetylierung an Histonen, während Histondeacetylasen (HDAC) für den gegensätzlichen Prozess, der Deacetylierung, zuständig sind. Eine Acetylierung bedeutet in der Regel eine erhöhte Transkriptionsaktivität für die entsprechenden Genbereiche. Zudem ermöglicht die Acetylierung am Histon weitere Histonmodifikationen, da viele Enzyme direkt oder indirekt an acetylierten Lysinresten binden [66]. Eine Deacetylierung erschwert als gegensätzlicher Effekt den Zugang von Transkriptionsfaktoren zur DNA. Dies führt zu einer Repression der DNA und begünstigt eine Heterochromatisierung. Eine weitere Möglichkeit zur Histonveränderung besteht in der Methylierung von Arginin- oder Lysinresten. Der Unterschied zur Acetylierung besteht in zwei wesentlichen Punkten. Einerseits handelt es sich um länger andauernde Modifikationen, die lange Zeit als ein irreversibler Prozess gehandelt wurden. Mittlerweile sind jedoch Enzyme bekannt, die imstande sind eine Demethylierung zu katalysieren – wie z. B. das LSD1 [74]. Andererseits bedeutet eine Methylierung nicht zwangsläufig eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität, sondern hat vielfältige Konsequenzen. Diese sind abhängig von Modifikationsort und weiteren Histonmodifikationen und können sowohl eine Aktivierung, als auch eine Repression der Transkription bedeuten. Argininreste können neben einer Methylgruppe auch symmetrische oder asymmetrische Dimethylgruppen aufnehmen. Lysinreste sind zudem imstande maximal Trimethylgruppen aufzunehmen. Daraus ergibt sich ein größeres Modifikationspotential als bei anderen Histonmodifikationen. Lysin als Angriffspunkt der Methylierung weist ein breites Spektrum an Modifikationsfolgen auf [75-77]. Zusätzlich zum Einfluss auf die Transkriptionsaktivität können Methylierungen am Lysin eine Heterochromatisierung einleiten oder zu einer Chromosomeninaktivierung führen. Ubiquitierung, SUMOylierung und Phosphorylierung stellen weitere Histonmodifikationen dar. Unklar ist, ob diese Modifikationen mit derart großen Proteinen wie das Ubiquitin oder das SUMO direkt die Nukleosomenstruktur beeinflussen oder dieser Einfluss indirekt über Interaktionen mit anderen Proteinen bzw. Enzymen vermittelt wird [78]. Phosphorylierung von Histonen ist ebenfalls wie Ubiquitierung und SUMOylierung ein reversibler Prozess.

1.8. Ziele der Studie

Das Ziel der vorliegenden Studie ist, die histo-pathologischen Kriterien zur Dignitätsbestimmung der Insulinome um entscheidende Prognosemarker zu erweitern. Ähnlich den Bestrebungen von Seligson et al. beim Prostatakarzinom [79] soll mit der Untersuchung des globalen Histonmodifikationsmusters möglich gemacht werden, den klinischen Verlauf genauer vorhersagen zu können, um damit eventuell eine frühzeitige Anpassung der Therapie vorzunehmen. Zusätzlich sollen diese neuen Prognosemarker mit der WHO-Klassifikation von 2004 und der TNM-Klassifikation von 2006/2007 hinsichtlich ihrer Korrelation und Aussagekraft überprüft werden.

Im Grunde stellen Histonmodifikationen eine Möglichkeit dar, der Zelle den Zugang zu Informationen zu ermöglichen oder zu verwehren. Diese Informationen entsprechen Genabschnitten für Proteine und Enzyme, die unter anderem für Zellwachstum, Proliferation, Stoffwechsel oder auch programmierten Zelltod notwendig sind. Dies erklärt, weshalb Fehlregulationen am *histone code* zur Tumorgenese beitragen können. Der *histone code* ist in diesem Zusammenhang gleichzusetzen mit der Gesamtheit aller bestehenden Histonmodifikationen einer Zelle. Es ist zudem bekannt, dass Modifikationen an bestimmten Stellen der Histone einen entscheidenden Einfluss auf die Transkription entsprechender Genabschnitte haben unabhängig von der Genregulation auf DNA-Basen-Ebene durch z.B. Tumorsuppressorgene [80]. DNA-Methyltransferasen (DNMT) weisen nur eine geringe Sequenzspezifität auf und sind daher auf Histonmodifikationen als Signalgeber angewiesen. Ein Beispiel hierfür ist die Methylierung an H3 K9, die als Markierung für DNA-Methyltransferasen wirkt [81]. Über die Histonmodifikationsenzyme (HME) ist bekannt, dass sie eine hohe Substratspezifität aufweisen und gleichzeitig Histone der meisten DNA-Bereiche modifizieren können. Dies hat zur Konsequenz, dass eine selektive Veränderung an einem bestimmten Histonrest durch ein HME auf globaler Ebene signifikant unterscheidbare Ausmaße annehmen kann. Basierend auf dieser Überlegung sollen folgende Histonmodifikationen am Insulinom global untersucht werden: Acetylierung an H3 K9, H3 K18 und H4 K12 und Dimethylierung an H3 K4 und H4 R3.

2. Patienten, Material und Methoden

2.1. Patienten

Die vorliegende Promotionsarbeit beinhaltet zusätzlich zu einer experimentellen Untersuchung eine retrospektive Datenerhebung. Sie erfasst insgesamt 63 Patienten aus dem Zeitraum von 1980 bis 2005 mit der Diagnose eines pankreatischen Hyperinsulinismus auf Basis eines solitären Insulinoms. Bei Patienten mit benignem Insulinom war zudem Bedingung, dass postoperativ keine Symptome des pankreatischen Hyperinsulinismus festzustellen waren und diese durch die Operation als geheilt galten. Patienten mit anderen Ursachen eines pankreatischen Hyperinsulinismus wurden aus der Studie ausgeschlossen, wie beispielsweise Insulinomatosen, Nesidioblastosen, hereditären MEN-1 assoziierten und nicht-MEN-1 assoziierten Adenomatosen. Desweiteren blieben Patienten mit anderen Ursachen wiederholter Hypoglykämien wie z. B. einer „hypoglycaemia factitia“ (externe Insulinzufuhr mit Insulinüberdosierung) unberücksichtigt.

Die Patienten wurden aus dem Archiv der „Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie“ am „Universitätsklinikum Düsseldorf“ (UKD) ermittelt. Als Grundlage diente hierbei eine Patientendatenbank, die von der Arbeitsgruppe „Schwerpunkt: Neuroendokrine Chirurgie“ (ehemals: Prof. Dr. med. C. F. Eisenberger, Prof. Dr. med. A. Raffel, PD Dr. med. M. Krausch) erstellt wurde. Dieser Informationsbestand wurde um geeignete Patienten erweitert und auf den Stand vom 02.02.2007 aktualisiert. Hierzu wurden aus den Patientenakten folgende Angaben erhoben und im späteren Verlauf anonymisiert ausgewertet: Name, Geburtsdatum, Geschlecht, Anschrift, Hausarzt, Tumorgröße, Tumorlokalisierung, Metastasierungsverhalten, Operationsdatum, Operationsmethode, postoperativer Verlauf, Rezidivverhalten. Anhand der histologischen Befunde wurden die entsprechenden Paraffinblöcke mit den Tumorproben und ihre H.E.-Schnitte aus dem Archiv des „Instituts für Pathologie“ am UKD ermittelt. Anschließend wurde die Gewebequalität am H.E.-Schnitt beurteilt und die Insulinome wurden nach dem WHO Schema von 2004 unter Zuhilfenahme der histologischen Befunde eingeteilt. Eine zweite Beurteilung und WHO-Einteilung wurde am „Institut für Pathologie“ des „Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel“ (Uk-SH Kiel) im Rahmen der Vorbereitungen zum

Erstellen der *tissue microarrays* durchgeführt. Es folgte eine weitere Einteilung nach der TNM-Klassifikation von 2007 auf Grundlage der bereits erhobenen Daten. Von ursprünglich 80 Patienten wurden 12 Patienten mit benignem Insulinom, 3 Patienten mit Insulinom fraglicher Dignität und 2 Patienten mit malignem Insulinom aussortiert. Gründe hierfür waren u.a. eine schlechte Fixierung mit zerstörtem Gewebe, ausschließlich Nekrosen oder zu wenig Tumorgewebe. 2007 wurde eine Anfrage beim Melderegister gestellt zum zuletzt bekannten Patientenwohnsitz mit dem Ziel bereits verstorbene Patienten und ihr Todesdatum zu ermitteln. Bei noch lebenden Patienten mit fehlenden Angaben zum klinischen Verlauf wurden Hausarzt und Patient telefonisch befragt. Von allen Patienten lag das Einverständnis vor, die erhobenen Daten in anonymisierter Form zu speichern und zur wissenschaftlichen Auswertung zu verwenden. Datenerhebungsprozesse sowie unternommene Schritte zur Vorbereitung und Durchführung der *tissue micorarrays* und histologischen Färbungen wurden zudem in einem Laborbuch protokolliert.

2.2. Gewebeaufbereitung

2.2.1. *tissue microarray* (TMA)

Das Erstellen eines *tissue microarray* (TMA) ist eine etablierte Methode in der onkologischen Forschung. Der *tissue arrayer* ermöglicht eine manuelle Anordnung von bis zu 1000 Gewebeproben auf einem Paraffinblock (siehe Abbildung 4). Es besitzt zwei Stanzen, die sich auf einem Koordinatensystem präzise im Mikrometerbereich bewegen: Die erste Stanze bohrt Löcher im Empfängerparaffinblock, während die zweite Stanze Proben aus dem zu untersuchenden Gewebe entnimmt und in den leeren Paraffinblock einsetzt. Die Gewebeproben lassen sich dadurch exakten Koordinaten auf der X- und Y-Achse zuordnen. Ein TMA mit mehreren hundert Gewebeproben weist bei der darauf folgenden histologischen Färbung oder *In-situ*-Analyse einige Vorzüge auf. Bei einer angestrebten immunhistochemischen Färbung beispielsweise werden alle Proben simultan gefärbt. Das ermöglicht bei einer großen Anzahl an Patienten und Gewebeproben eine kosten- und zeiteffektivere Untersuchung. Ein weiterer Vorteil ist die sparsame Nutzung von Tumorgewebe, indem aus einem vorher bestimmten Bereich des Tumors Proben entnommen werden und lediglich dieser Anteil zur

weiteren Untersuchung genutzt wird. Insbesondere bei sehr seltenen Tumorentitäten ist das wichtig, da das verfügbare Untersuchungsmaterial zumeist den limitierenden Faktor für umfangreiche Untersuchungen darstellt.

2.2.1.1. Vorbereitung

Die Vorbereitung der Gewebeproben zum Erstellen der *tissue microarrays* erfolgte am Pathologischen Institut des Uk-SH Kiel. Hierzu wurden, für jeden Paraffinblock, auf dem entsprechenden konsekutiven H.E.-Schnitt, mindestens zwei repräsentative Stellen Tumorgewebe und zumeist eine Stelle Pankreasnormalgewebe ausgewählt und mit einem Folienstift markiert. Das Ziel war von jedem Tumorgewebe möglichst zwei Stenzen zu fertigen, damit ausreichend Gewebe im TMA repräsentiert ist und der später ermittelte Mittelwert sich möglichst nah an der tatsächlichen Expression im Tumorgewebe befindet. Vom Normalgewebe genügte bei jedem Patienten maximal eine Stanze anzufertigen, da als Vergleichswert ein Gesamtwert von allen Normalgewebsstanzen bestimmt wurde. Nach der bereits erwähnten Überprüfung der WHO-Einteilung und der Aussortierung mangelhaften Gewebes wurde die geplante Anordnung der Gewebeproben auf insgesamt vier TMAs skizziert (siehe Tabelle 4). Konsekutive Synaptophysin-Schnitte unterstützten dabei beim Aufsuchen von Lokalisationen im Normalgewebe mit einer hohen Dichte an Langerhans'schen Inseln und beim Differenzieren des Normalgewebes von Tumorgewebe (siehe Kapitel 2.2.3 Synaptophysin-Färbung). Als Letztes wurden vier leere Paraffinblöcke gegossen.

Tabelle 4. tissue microarray**a) wd PET**
benigne Insulinome (TMA 1-1)

	A	B	C	D	E	F
1	X	X				
2	1P	1P	1N	1P	1P	2P
3	2P	2N	2P	2P	2N	3P
4	4P	4P	5P	5P	6P	6P
5	7P	7P	8P	8P	9P	9P
6	9N	10P	10P	11P	11P	11N
7	12P	12P	12N	13P	13P	14P
8	14P	15P	15P	16P	16P	17N
9	17P	17P	18P	18P	19P	19P
10	19N	20P	20P	21P	21P	22P
11	22P	23P	23P	23N	24P	24P

b) wd PET
benigne Insulinome (TMA 1-2)

	A	B	C	D	E	F
1	X	X				
2	25P	26P	26P	26N	27P	27P
3	28P	29P	29P	29N	30P	30P
4	31P	31P	31N	32P	32P	32N
5	33P	33P	34P	34P	35P	35P
6	36P	36P	37P	37P	38P	38P
7	38N	39P	39P	39N		

c) wd PETub
Insulinome unklarer Dignität (TMA 2)

	A	B	C	D	E	F
1	X	X				
2	40P	40P	41P	41P	41N	
3	42P	42P	43P	43P	43N	
4	44P	44P	45P	45P	46P	46P
5	47P ¹⁾	47N ¹⁾	48P	48P	49P	49P
6	50P	50P	50P	50P	51P	51P
7	52P	52P	52P	52P		

d) PEC
maligne Insulinome (TMA 3)

	A	B	C	D	E	F
1	X	X				
2	53P	53P	53Ly	53Ly	53Lb	53Lb
3	54P	54P	54N	55P	55P	55N
4	56P	56P	56Lb	56Lb	56N	
5	57P	57P	57N	57Ly	57Ly	
6	58Lb	58Lb	59Lb	59Lb		
7	60P	60P	61P	61P	61Lb	61Lb
8	62P	62P	62P	62P	62N	
9	62Ly	62Ly	62Lb	62Lb		
10	63Ly	63Ly				

¹⁾ benignes Insulinom (wd PET)

1 – 63 Patientennummer
P Primärtumor, Pankreas
N Normalgewebe, Pankreas

Ly Metastase, Lymphknoten
Lb Metastase, Leber
X Ausrichtungsmarkierung / Ausgangspunkt

2.2.1.2. Durchführung

Beim Erstellen der *tissue microarrays* wurden vor dem Einsetzen von Tumorgewebe auf dem TMA Paraffinblock zwei Ausrichtungsstanzen mit Tonsillengewebe gesetzt, die den Nullpunkt im Koordinatensystem darstellen und die Leserichtung vorgeben (siehe Abbildung 4D). Die bereits am Vortag an den H.E.-Schnitten erstellten Markierungen wurden vor der Stanzentnahme jeweils auf die Paraffinblöcke übertragen. Der Durchmesser der Gewebestanzungen beträgt 1,5 mm. Bei der Anordnung der Gewebestanzungen wurde ein Abstand von 0,5 mm eingehalten. Bei jedem Stanzprozess wurde zunächst ein Loch im leeren Paraffinblock gestanzt. Dann wurde mit einer gering größeren Stanze das Gewebe aus dem Spenderblock entfernt und in das vorgefertigte Loch im Empfängerblock eingesetzt. Dadurch wurde die Wahrscheinlichkeit reduziert, dass das eingesetzte Gewebe mobil ist und beim anschließenden Schneiden von seiner Position abweicht. Zur zusätzlichen Stabilität des eingebetteten Gewebes wurden die TMAs bei 40°C über Nacht im Trockenschrank aufbewahrt.

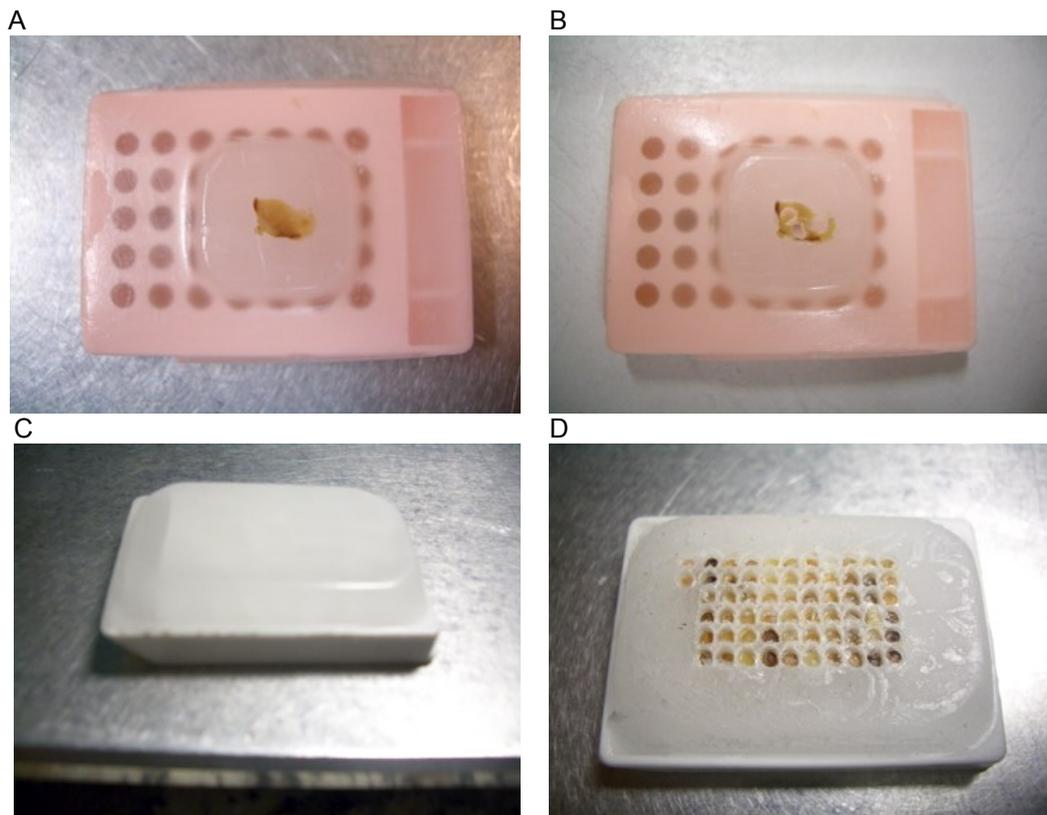


Abbildung 4. Tissue Micro Array

(A), (B) Donorblock, Pankreas, Insulinom, vor bzw. nach Stanzentnahme (C) leerer Empfänger-Paraffinblock, (D) fertiger TMA-Block

2.2.2. Hämalaun-Eosin-Färbung

Zur Darstellung der Gewebemorphologie wurde parallel zur immunhistochemischen Synaptophysin- und Histonfärbung ein konsekutiver Gewebeschnitt von jedem TMA mit der Hämalaun-Eosin-Methode gefärbt (siehe Abbildung 5). Nach Entparaffinieren, Demaskieren (siehe Kapitel 2.3.2.2 Protokoll / Durchführung) und einer kurzen Rehydrierung in destilliertem Wasser erfolgte die Anfärbung in Hämalaun nach P. Mayer (Merck KGaA, Darmstadt) für 5'. Hämalaun bindet unter anderem an die negativ geladenen Phosphatgruppen von Nukleinsäuren, welches in einer bläulichen Anfärbung der Kernstruktur resultiert. Anschließend wurden die Präparate kurz in destilliertes Wasser getaucht und für 3' mit 1%igem Eosin gegengefärbt. Eosin bindet elektrostatisch an positiv geladene Proteingruppen und färbt das Zytoplasma und Bindegewebsstrukturen rötlich an. Im Anschluss wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 80 % über 96 % auf 100 % Isopropanol für jeweils 2 x 2' dehydriert. Nach Behandlung der Gewebeschnitte mit Rotihistol für 2 x 2' wurden die Schnittpräparate mit dem Entellan Neu (Merck KGaA, Darmstadt) überschichtet, zur Fixierung der aufgelegten Deckgläser nach Lufttrocknung über Nacht.

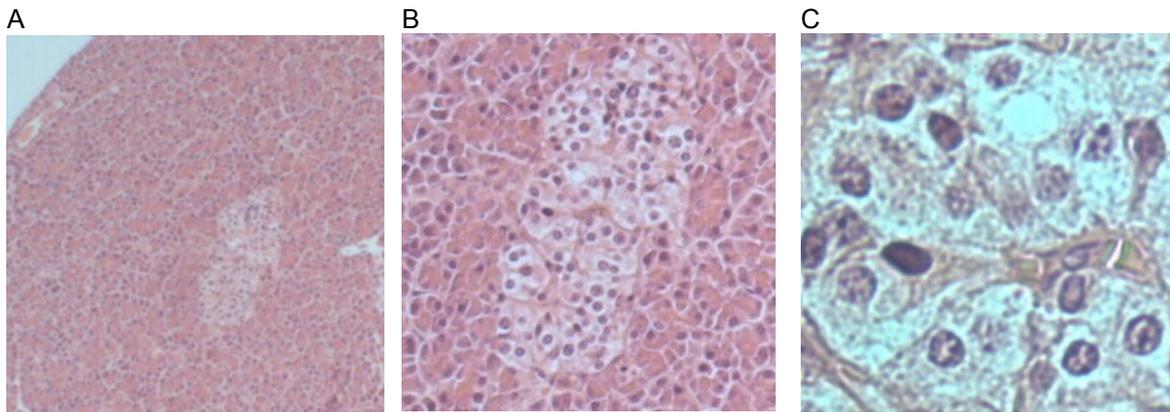


Abbildung 5. H.E. Färbung

exokrines Pankreas mit Langerhans'scher Insel in (A) 4facher, (B) 10facher und (C) 40facher Vergrößerung

2.2.3. Synaptophysin-Färbung

Typischerweise lassen sich NET laborchemisch und immunhistochemisch durch die Expression von Synaptophysin und Chromogranin A nachweisen. Für eine genauere Detektion neuroendokriner Tumorzellen fand hier eine Synaptophysin Färbung Anwendung (siehe Abbildung 6). Die Synaptophysin Färbung ermöglicht die bessere Tumorbeurteilung in paraffinisierem Gewebe. Langerhans'sche Inseln und Insulinomzellen lassen sich sicherer vom übrigen Gewebe abgrenzen. Synaptophysin ist als integrales Membranglykoprotein Bestandteil präsynaptischer Vesikel. Durch den Antikörper SY38 (Anti-Human Synaptophysin: monoklonaler Maus-AK, Klon SY38, Kode-Nr. M 0776, Verdünnung 1:50, Fa. DAKO) wird das Synaptophysin gebunden. Mithilfe eines Sekundärantikörpers, welcher gegen das SY38 gerichtet ist, und der Immunperoxidase Avidin-Biotin werden diese Vesikelbestandteile immunhistochemisch gefärbt und in normalen und neoplastischen Geweben sichtbar gemacht. Synaptophysin wurde bisher u. a. in Nervenzellen nachgewiesen, in Neuroblastomen, kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, sowie in epithelialen neuroendokrinen Neoplasien, wie Phäochromozytome, medulläre Schilddrüsenkarzinome und Hypophysenadenome [82].

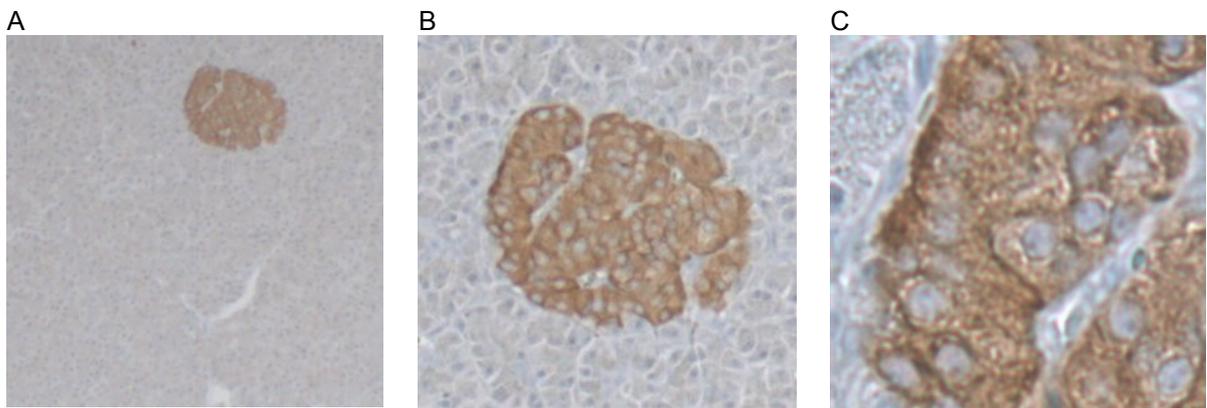


Abbildung 6 – Synaptophysin Färbung

exokrines Pankreas mit Langerhans'scher Insel in (A) 4facher, (B) 10facher und (C) 40facher Vergrößerung

2.3. Immunhistologische Färbung

2.3.1. Avidin-Biotin-Complex-Färbemethode

Zur Darstellung der gesuchten Histonmodifikationen wurden, analog zur Arbeit von Seligson et al, Primärantikörper mit entsprechenden Verdünnungen verwendet (siehe Tabelle 5) [79]. Diese binden spezifisch an ein bestimmtes, modifiziertes Histon. Im nächsten Schritt finden Sekundärantikörper, die gegen den Fc-Abschnitt des Primärantikörpers gerichtet sind, Anwendung. Diese besitzen eine biotinylierte Untereinheit, die zusammen mit einem Avidin-Enzym-Complex ein Makromolekül bildet und in Gegenwart des DAB-Chromogen-Substrats einen durch das bloße Auge sichtbaren Farbstoff umsetzt. Es handelt sich hierbei um eine indirekte Färbemethode, die durch den großen Avidin-Biotin-Complex – das Avidinmolekül kann bis zu vier Biotinmoleküle binden – eine hohe Färbewirkung erzielt. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle gefärbt (siehe Abbildung 7).

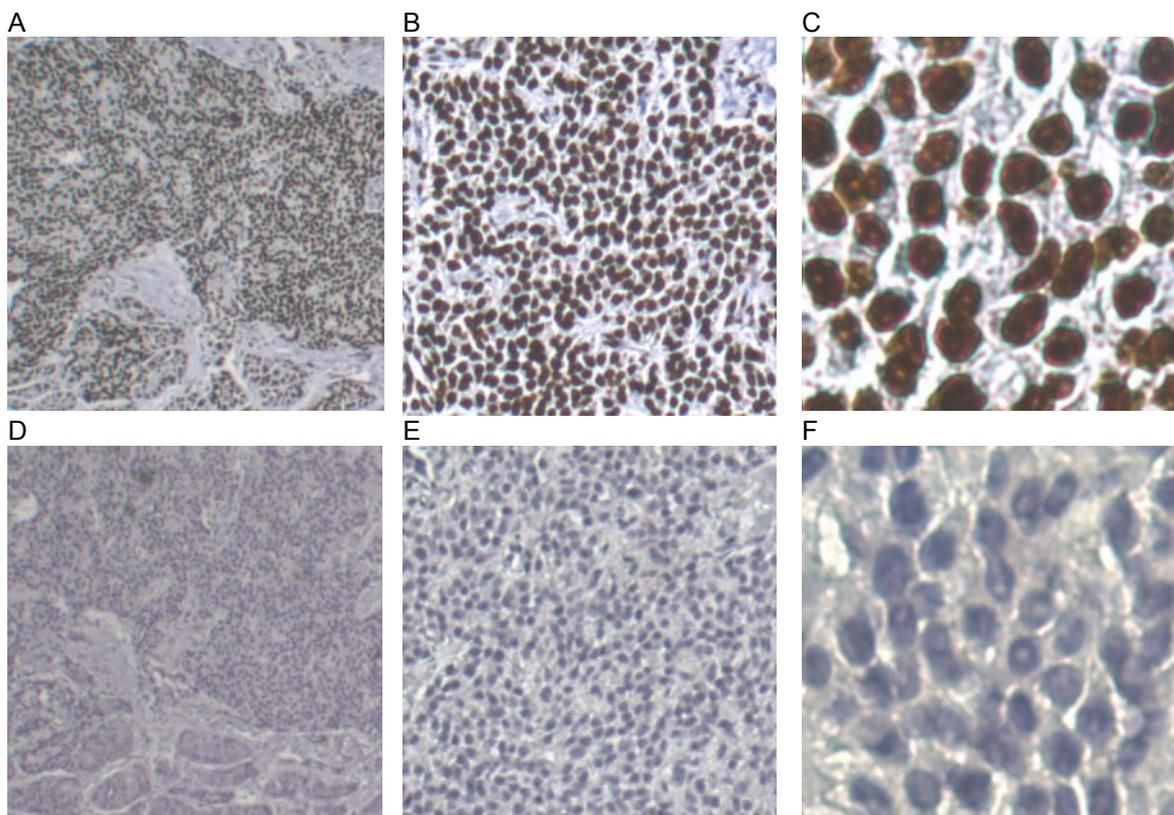


Abbildung 7. Pankreas, benignes Insulinom (WHO 1A)

Histonfärbung, H4 R3 (Anzahl positiver Zellen 100 %, Expressionsstärke +++ in (A) 4facher, (B) 10facher, (C) 40facher Vergrößerung; Negativkontrolle (Anzahl positiver Zellen 0%, Expressionsstärke -) in (D) 4facher, (E) 10facher, (F) 40facher Vergrößerung

Tabelle 5. Primärantikörper – Histonmodifikationen

Spezifität	Spezies	Firma	Katalog-Nr.	Verdünnung
H4 K12Ac	Rabbit	Abcam	ab 1761	1:100
H3 K18Ac	Rabbit	Abcam	ab 1191	1:200
H3 K4diMe	Rabbit	Abcam	ab 7766	1:800
H3 K9Ac	Rabbit	Abcam	ab 4441	1:800
H4 R3diMe (non-symmetric)	Rabbit	Upstate (Chemicon)	# 07-213	1:25

H Histon
 K Lysinrest am Histon
 R Argininrest am Histon

2.3.1.1. Reagenzien

- 10 % AB-Serum (Biotest, Ref 805135) in DPBS 1x (pH 7,4)
- 10x Target Retrieval Solution (Dako S1699): 1:10 in Aqua dest. verdünnt
- Xylol (Merck, 1.08685.2500)
- PBS-Tabletten (Gibco, 18912-014)
- DPBS (Gibco, 14190-169)
- H₂O₂ (Merck, 8597.1000 304K19013597, 1L): 0,3%ig in PBS-Lösung
- ABC-Kit (Vectastain, Peroxidase: Goat IgG PK-4005; Rabbit IgG: PK-4001):
 5 Tage haltbar bei 4°C, Ansatz mit DPBS (Gibco)
 - „Normalserum“: 3 Tropfen ad 10 ml PBS-Lösung
 - Sekundärantikörper („biotinylated antibody“): 1 Tropfen ad 10 ml PBS-Lösung
 - Vectastain ABC-Reagenz: 2 Tropfen Reagenz A, 2 Tropfen Reagenz B ad 10 ml PBS-Lösung
- DAB (Dako, DAB + Chromogen, K3468): 1 Tropfen DAB Chromogen / ml Substratpuffer zur Herstellung von DAB-Substrat
- Mayers Hämalaun (Merck, 1.09249.2500)
- Wasserbad (Memmert)
- Entellan (Merck, 1.07961.0100)
- Liquid Blocker Super Pap Pen Mini (MBT Brand, 297840010)
- Primärantikörper (siehe Tabelle 7)

2.3.1.2. Protokoll

- Beschriften der Gewebeschnitte
- Entparaffinieren:
 - 3x je 10 Minuten in Xylol
- Absteigende Alkoholreihe: je 5 Minuten
 - 2 x 99,5 % Ethanol
 - 2 x 96 % Ethanol
 - 2 x 80 % Ethanol
 - 1 x 70 % Ethanol
 - Aqua dest. mind. 5 Minuten
- Demaskierung, Freimachen von Epitopen:
 - 1x Retrieval Solution (ca. 200 -250 ml/Gefäß) direkt beim Aufheizen in das Wasserbad stellen
 - 30 Minuten bei 95°C im Wasserbad
 - anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur abkühlen lassen
 - 5 Minuten in PBS-Lösung waschen
 - Aqua dest.
- Inhibieren der endogenen Peroxidase:
 - 30 Minuten in 0,3 % H₂O₂-PBS bei Raumtemperatur
 - 5 Minuten in PBS-Lösung waschen
- Umranden der Schnitte mit Liquid Blocker Super Pap Pen Mini
- Blocking:
 - 20 Minuten in „Normalserum“ (gelbes Fläschen, ABC-Kit), abkippen des Blockingserums → nicht waschen!
- Primärantikörper:
 - 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
 - 2x3 Minuten in PBS-Lösung waschen
- Sekundärantikörper („biotynlated antibody“, blaues Fläschen, ABC-Kit):
 - 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
 - 2x3 Minuten in PBS-Lösung waschen
- Vectastain ABC-Reagenz (oranges Fläschen, ABC-Kit):
 - Mind. 30 Minuten vor Gebrauch ansetzen!
 - 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
 - 5 Minuten in PBS-Lösung waschen
- Visualisieren:
 - DAB Substrat → unbedingt frisch ansetzen!
 - 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubieren
 - 2x5 Minuten in Leitungswasser waschen
- Kernfärbung:
 - 15 Sekunden in Mayers Hämalaun
 - 15 Minuten fließend wässern, je nach Schnittqualität
 - Kurz in Aqua dest. stellen
- Aufsteigende Alkoholreihe: je 1 Minute
 - 70 % Ethanol
 - 80 % Ethanol
 - 99 % Ethanol
- Mindestens 2 Minuten in Xylol
- Eindeckeln mit Entellan

2.4. Auswertung

Im Rahmen der Auswertung wurden Stenzen mit zu starken Schnitt- oder Färbeartefakten aussortiert und im Laborbuch vermerkt. Zusätzlich zur eigenen Auswertung erfolgte eine zweite, geblindete und somit unabhängige Auswertung von Dr. med. Tobias Henopp in der Pathologie am Uk-SH Kiel. Dabei wurden die TMAs in anonymisierter Form übergeben. Es wurde lediglich markiert, ob es sich bei der Stanze um Normal- oder Tumorgewebe handelt, damit nicht das gesamte Normalgewebe, sondern ausschließlich Langerhans'sche Inseln ausgewertet werden. Der jeweilige Mittelwert der zwei Auswertungen wurde zur anschließenden Analyse verwendet.

2.4.1. Mikroskopie / EDV-basierte Auswertung

Die Auswertung erfolgte für alle Gewebeschnitte an dem selben PC mit denselben angeschlossenen Peripherie-Geräten. Hierbei wurde als Kamera eine Leica DFC280, mit einer Leica DM IL als Mikroskop und dem Leica IM 50 als EDV-Programm in der Version 4.0 Release 117 (Leica Microsystems Imaging Solutions Ltd. United Kingdom, www.leica-microsystems.com) verwendet. Um bei der Auswertung eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit zu erreichen, wurde bei jedem Gewebeschnitt die gleiche Belichtungszeit, die gleiche Helligkeit, die gleiche Auflösung und Vergrößerung, sowie ein softwaregesteuerter Farbausgleich bei 90%-Bildschirmhelligkeit verwendet.

Bei der Auswertung erfolgt das Aufsuchen der Stanze auf dem Koordinatensystem in der 4X-Vergrößerung. Dann wird gegebenenfalls, bei inhomogenem Gewebe, in der 4X- und in der 10X-Vergrößerung, innerhalb der Stanze, das zu beurteilende Gewebe aufgesucht. Beispiele hierfür sind z.B. die Langerhans'schen Inseln im Normalgewebe und die Tumorzellverbände bei Metastasen in Lymphknoten oder Leber. Geweberänder und gestauchtes Gewebe werden grundsätzlich bei der Auswertung gemieden. Im letzten Schritt erfolgt in der 40X-Vergrößerung die Auswertung des Gewebes mit Bestimmung der Färbeintensität und der geschätzten Anzahl der gefärbten Zellkerne. Da es sich um eine nukleäre Färbung handelt,

erfolgte eine Notiz bei einer zusätzlichen zytoplasmatischen Färbung, möglicherweise als Ausdruck eines Zellschadens oder eines hohen Gewebeaters. Zusätzlich wird notiert, falls das gefärbte Gewebe eine Heterogenität innerhalb der Stanze oder zwischen zwei Stanzen des selben Ursprunggewebes aufweist. Bei Färbungsinhomogenitäten wird mit dem Vergleich zu anderen Schnitten geprüft, ob es sich um ein Färbeartefakt handelt, mit dem Ziel ausschließlich den repräsentativen Anteil auszuwerten.

2.4.2. Beurteilung der Expression

Es werden Anzahl der positiv gefärbten Zellkerne in Prozent bestimmt und ihre Expressionsstärke. Die Expressionsstärke reicht dabei von „keine Expression“ bis „starke Expression“. Mit der Überlegung, dass beide Aspekte möglicherweise unabhängig voneinander eine Bedeutung haben, wird ein Bewertungssystem verwendet, das beiden Aspekten einen numerischen Wert zuweist und in einem Score-System miteinander multipliziert (siehe Tabelle 6) [83]. Das System weist dabei dem Aspekt „Anzahl positiver Zellen“ eine statistisch höhere Bedeutung zu.

Tabelle 6. Auswertungskriterien

Expressionsstärke									
Score 1	0	1	2	3					
	keine Expression	schwache Expression	mäßiggradige Expression	starke Expression					
Anzahl positiver Zellen									
Score 2	0	1	2	3	4				
	0 %	1 – 10 %	11 – 50 %	51 – 80 %	81 – 100 %				
Gesamt-Score									
Score 1 x Score 2	0	1	2	3	4	6	8	9	12

2.4.3. Statistische Analysen

Zum Berechnen der Statistik wurde SPSS in der Version 17.0 für Windows benutzt. *Boxplots* dienten zur Darstellung und zum Vergleich der Expression verschiedener Histonmodifikationen in den unterschiedlichen Geweben. Der Kruskal-Wallis Test wurde hierbei als Suchtest für bestehende Signifikanzen genutzt. Im Anschluss diente der Mann-Whitney-U Test zur Überprüfung signifikanter Unterschiede jeweils zweier Gewebe. Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurden erstellt. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz zweier unterschiedlicher Parameter hinsichtlich des Überlebens wurde jeweils ein *log-rank* Test durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv besteht aus 43 Frauen (68 %) und 20 Männern (32 %) – Verhältnis 2,15:1. Der Altersmedian beträgt 49 Jahre (16 – 82 Jahre), das mittlere Alter $49,7 \pm 17,3$ Jahre (siehe Tabelle 7a). Der klinische Verlauf jedes Patienten wurde vom Operationstag bis zur letztmaligen Statusabfrage am 02.02.2007 bzw. bei vorzeitigem Versterben bis zum Todestag berücksichtigt, wobei der durchschnittliche Beobachtungszeitraum (Follow-up) bei 8,8 Jahren (0,1 – 26,7 Jahren) liegt. Beim untersuchten Patientenkollektiv finden sich 40 Patienten (63,4 %) mit einem benignen Insulinom (wd PET), 12 Patienten (19,2 %) mit einem Insulinom fraglicher Dignität (wd PETub) und 11 Patienten (17,4 %) mit einem malignen Insulinom (wd/pd PEC) (siehe Tabellen 7b). Das Verhältnis von Frauen zu Männern liegt für wd PET bei 2,33:1, für wd PET ub bei 2:1 und für wd/pd PEC bei 1,75:1. Rezidive entwickelten 7 Frauen und 4 Männer – Verhältnis 1,75:1. Verstorben sind 3 Frauen und 4 Männer – Verhältnis 1:1,33. Dabei betrug das Durchschnittsüberleben bei den Männern 2,2 Jahre und bei den Frauen 3,0 Jahre.

Tabelle 7a. Patientenkollektiv – demographisch-klinische Parameter

Parameter	männlich (n=20; 32 %)	Verhältnis 1 : 2,15	weiblich (n=43; 68 %)	Insgesamt (n=63; 100 %)
Altersmedian	51 (20 – 82)		47,5 (16 – 79)	49 (16 – 82)
Mittleres Alter	$46,7 \pm 16,9$		$51,1 \pm 17,5$	$49,7 \pm 17,3$
Dignität				
wd PET	12 (60 %)	1 : 2,33	28 (65,1 %)	40 (63,4 %)
wd PET ub	4 (20 %)	1 : 2	8 (18,6 %)	12 (19,2 %)
PEC	4 (20 %)	1 : 1,75	7 (16,3 %)	11 (17,4 %)
Rezidiv	4 (20 %)	1 : 1,75	7 (16,3 %)	11 (17,4 %)
Exitus	4 (20 %)	1,33 : 1	3 (7 %)	7 (11,1 %)
Überleben (Jahre)*	0,3 – 4,6 ($\bar{\varnothing}$ 2,2)		0,1 – 7,3 ($\bar{\varnothing}$ 3,0)	0,1 – 7,3 ($\bar{\varnothing}$ 2,5)
Follow-up (Jahre)**	0,3 – 20,8 ($\bar{\varnothing}$ 9,3)		0,1 – 26,7 ($\bar{\varnothing}$ 8,7)	0,1 – 26,7 ($\bar{\varnothing}$ 8,8)

$\bar{\varnothing}$ Durchschnitt

* Zeitspanne zwischen OP-Tag und Todestag
(noch lebende Patienten unberücksichtigt)

** Zeitspanne zwischen OP-Tag und aktueller Patientenstatusabfrage (02.02.2007) bzw. Todestag
(alle Patienten berücksichtigt)

Tabelle 7b. Patientenkollektiv – pathologisch-klinische Parameter

Parameter	wd PET (n=40; 63,4 %)	wd PET ub (n=12; 19,2 %)	PEC (wd; pd) (n=11; 17,4 %)	Insgesamt (n=63; 100 %)
Tumorgröße (mm)	7 – 20 (Ø 12,5)	10 – 35 (Ø 24)	7 – 80 (Ø 29)	7 – 80 (Ø 17,5)
Lokalisation				
Kopf	8 (20 %)	4 (33,3 %)	2 (18,2 %)	14 (22,2 %)
Korpus	11 (27,5 %)	2 (16,7 %)	1 (9,1 %)	14 (22,2 %)
Schwanz	21 (52,5 %)	6 (50 %)	4 (36,4 %)	31 (49,2 %)
Diffus ^I	-	-	4 (36,4 %)	4 (6,4 %)
Metastasen ^{II}	-	-	9 (81,8 %)	9 (14,3 %)
Lymphknoten	-	-	3 (27,3 %)	3 (4,8 %)
Leber	-	-	7 (63,6 %)	7 (11,1 %)
Knochen	-	-	1 (9,1 %)	1 (1,6 %)
OP-Methode				
Enukleation	29 (72,5 %)	7 (58,3 %)	0	36 (57,2 %)
Schwanzresektion	5 (12,5 %)	4 (33,3 %)	1 (9,1 %)	10 (15,9 %)
Pankreaslinksresektion	5 (12,5 %)	0	5 (45,5 %)	10 (15,9 %)
Whipple-OP	1 (2,5 %)	1 (8,3 %)	2 (18,2 %)	4 (6,4 %)
Subtotale Pankreatektomie	0	0	3 (27,3 %)	3 (4,8 %)
Rezidive	-	2 (16,7 %)	9 (81,8 %)	11 (17,4 %)
Exitus	-	-	7 (63,6 %)	7 (11,1 %)
Überleben (Jahre) ^{III}	-	-	0,1 – 7,3 (Ø 2,5)	0,1 – 7,3 (Ø 2,5)
Follow-up *	4,1 – 25,7 (Ø 9,6)	3,0 – 17,7 (Ø 10,6)	0,1 – 10,2 (Ø 3,8)	0,1 – 25,7 (Ø 8,8)
Lost to follow-up	1 (2,5 %)	-	-	1 (1,6 %)

Ø Durchschnitt

* Zeitspanne zwischen OP-Tag und aktueller Patientenstatusanfrage (02.02.2007) bzw. Todestag (alle Patienten berücksichtigt)

^I durch invasives Wachstum nicht eindeutig lokalisierbar^{II} vom Primärtumor entfernteste Metastase^{III} Zeitspanne zwischen OP-Tag und Todestag (noch lebende Patienten unberücksichtigt).

Unabhängig von der Dignität entspricht die durchschnittliche Tumorgröße 17,5 mm (7 – 80 mm). Aufgeteilt nach der Dignität beträgt die durchschnittliche Tumorgröße 12,5 mm beim wd PET, 24 mm beim wd PET ub und 29 mm beim wd/pd PEC (siehe Tabellen 7b). Bei der Lokalisation finden sich insgesamt 31 Insulinome (49,2 %) im Bereich des Pankreasschwanzes, 14 (22,2 %) im Pankreaskopf und 14 (22,2 %) im Pankreaskorpus. 4 Insulinome (6,4 %) sind

aufgrund ihres invasiven Wachstums nicht eindeutig lokalisierbar. Bei der OP-Methode finden sich beim wd PET 29 Eukleationen (72,5 %), 5 Pankreasschwanzresektionen (12,5 %), 5 Pankreaslinksresektionen (12,5 %) und 1 Whipple-OP (2,5 %). Beim wd PET ub sind es 7 Eukleationen (58,3 %), 4 Pankreasschwanzresektionen (33,3 %) und 1 Whipple-OP (8,3 %). Beim wd/pd PEC finden sich keine Eukleationen, 1 Pankreasschwanzresektion (9,1 %), 5 Pankreaslinksresektionen (45,5 %), 2 Whipple-OPs (18,2 %) und 3 subtotale Pankreatektomien (27,3 %). Die Metastasierung zeigt sich am häufigsten in der Leber (63,6 %), als die vom Primärtumor entfernteste Metastase, gefolgt von den Lymphknoten (27,3 %) und den Knochen (9,1 %). Rezidive zeigten in unserem Kollektiv einzig Tumore zugehörig zu wd PET ub und wd/pd PEC. Während beim wd PET ub nur 2 von 12 Patienten Rezidive zeigten (16,7 %), traten beim wd/pd PEC bereits bei 9 von 11 Patienten Rezidive auf (81,8 %). Ihrer Tumorerkrankung erlagen einzig Patienten mit wd/pd PEC. In unserer Beobachtungszeit verstarben 7 von 11 Patienten (63,6 %). Das vorzeitige Versterben erklärt die vergleichsweise kurze Beobachtungsdauer (*follow-up*) für wd/pd PEC mit nur durchschnittlich 3,8 Jahren (0,1 – 10,2 Jahren). Im Beobachtungszeitraum konnte einzig bei einem Patienten mit wd PET (1,6 %) der Krankheitsverlauf nach erfolgter Operation nicht erhoben werden (*lost to follow-up*).

3.2. Outcome

3.2.1. WHO Disease Stage (2004)

Der Vergleich der Überlebenskurven nach der WHO-Klassifikation von 2004 zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen WHO Stadien ($p < 0,005$) (siehe Abbildung 8). Das mediane Überleben bei Tumoren der WHO Stadien II + III beträgt 59,5 Monate ($n=11$). Tumore des WHO Stadiums Ib zeigen ein signifikant besseres medianes Überleben mit mindestens 174,3 Monaten ($n=12$). Das mediane Überleben beim WHO Stadium Ia liegt über dem maximalen Beobachtungszeitraum von 280,0 Monaten ($n=40$).

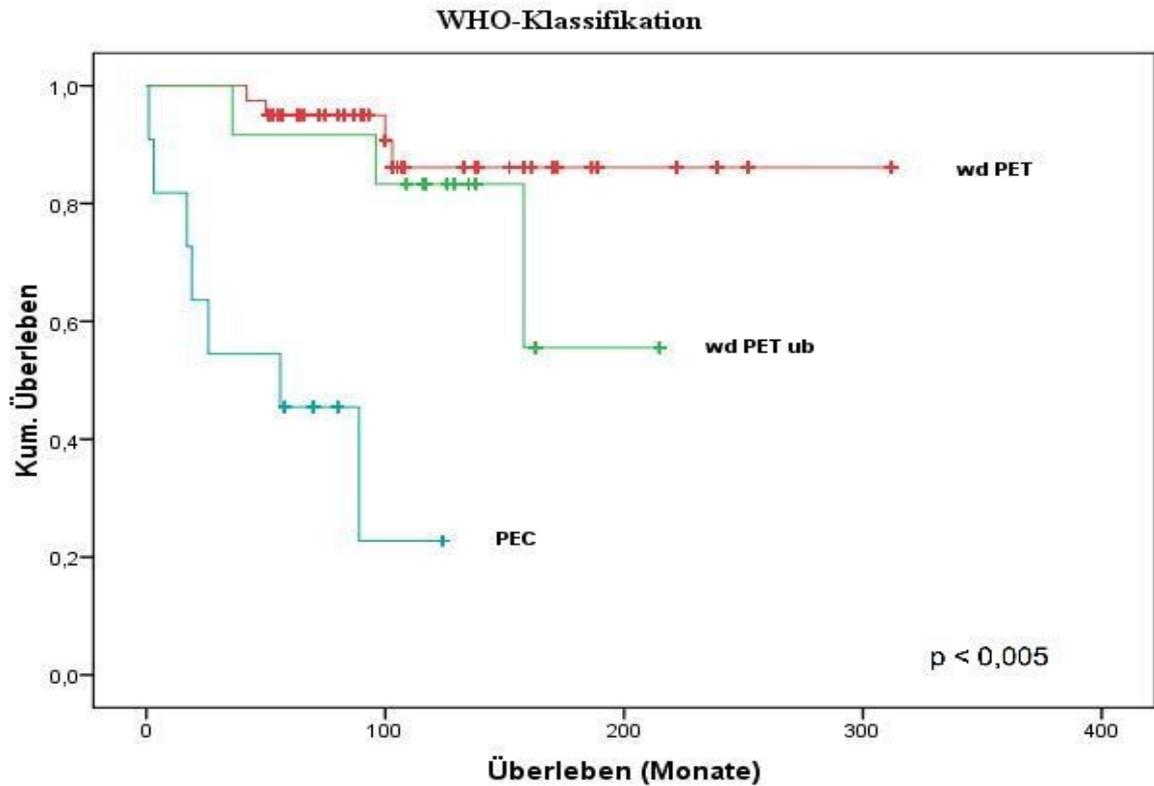


Abbildung 8. Kaplan-Meier-Überlebenskurven – WHO Disease Stage (2004)

3.2.2. TNM Disease Stage (2006/2007)

Bei der TNM-Klassifikation zeigt sich mit Fortschreiten des Tumorstadiums, ähnlich der WHO-Klassifikation, ein schlechteres Überleben (siehe Abbildung 9). Es finden sich signifikante Unterschiede zwischen TNM Stadium I (n=38) und IIa (n=14) ($p < 0,01$), zwischen TNM Stadium IIa und IIIb (n=2) ($p < 0,03$) sowie zwischen TNM Stadium IV (n=9) und allen weniger fortgeschrittenen Stadien ($p < 0,005$). Das mediane Überleben beträgt beim TNM Stadium I mehr als den maximalen Beobachtungszeitraum von 320,4 Monate, beim Stadium IIa 158,0 Monate, beim Stadium IIIb 26,0 Monate und beim Stadium IV versterben alle Patienten noch vor Ablauf der ersten 100 Monate. Im Kollektiv sind die TNM Stadien IIb und IIIa nicht vertreten. Einzig die TNM Stadien I und IIIb zeigen keinen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich des Überlebens ($p < 0,17$).

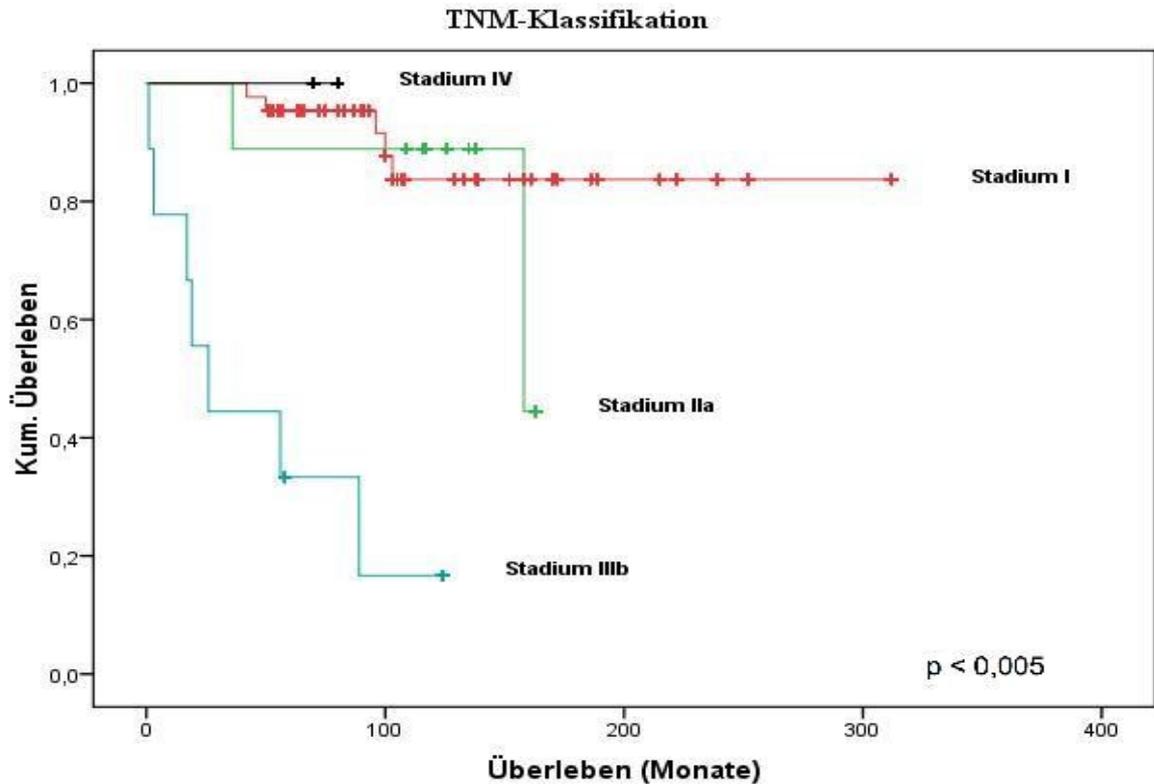


Abbildung 9. Kaplan-Meier-Überlebenskurven – TNM Disease Stage

3.2.3. Klinische Parameter

Beim Rezidivverhalten zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,005$). Das mediane Überleben ohne Auftreten eines Rezidivs beträgt mehr als 320,4 Monate ($n=47$). Falls mindestens ein Rezidiv auftritt, fällt das mediane Überleben auf 56 Monate ($n=15$) (siehe Abbildung 10a).

Durch eine Dichotomisierung der Patienten entsprechend ihres Alters konnte ein signifikant besseres Überleben gezeigt werden bei Patienten unter 60 Jahren ($n=44$) im Vergleich zu Patienten über 60 Jahren ($n=19$) ($p < 0,005$). Das mediane Überleben beträgt über 320,4 Monate beim jüngeren Kollektiv und 103,0 Monate beim älteren (siehe Abbildung 10b).

Ein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied zeigt sich hingegen nicht, mit einem medianen Überleben von mindestens 250 Monaten beim Kollektiv der Frauen ($n=43$) und über 320,4 Monate beim Kollektiv der Männer ($n=20$) ($p < 0,11$) (siehe Abbildung 10c).

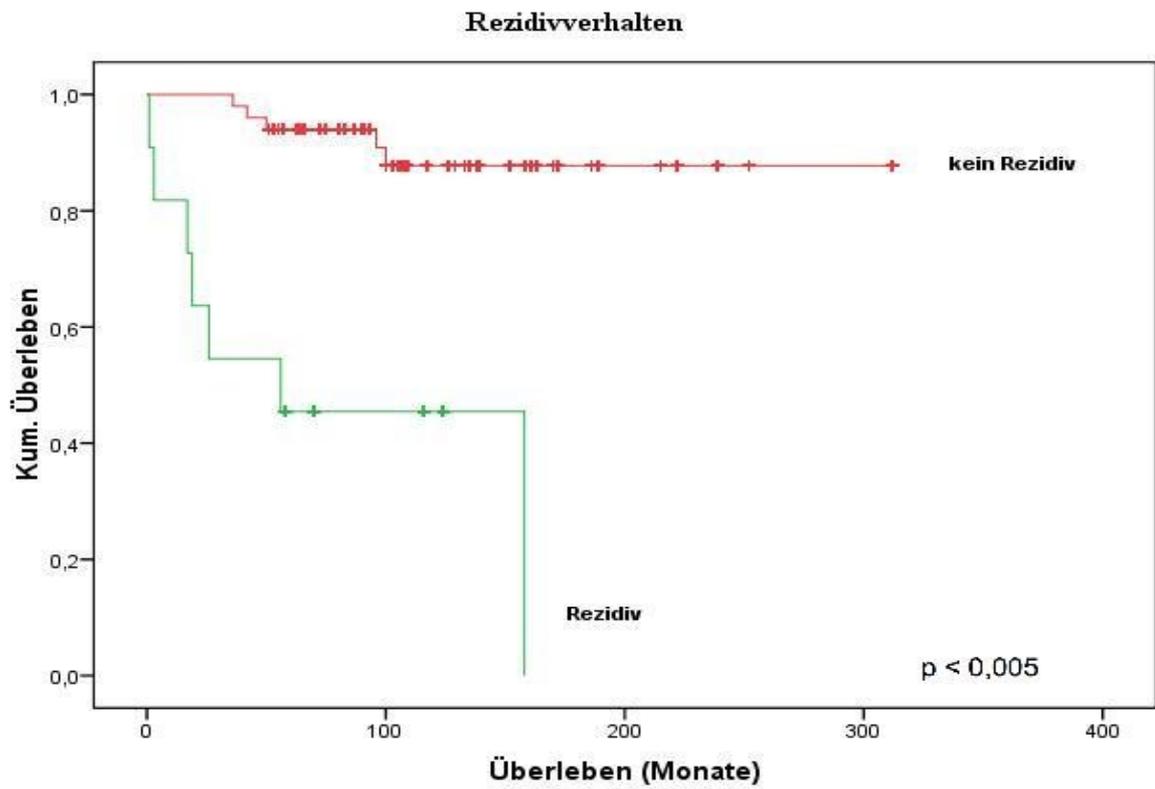


Abbildung 10a. Kaplan-Meier-Überlebenskurven – Rezidivverhalten

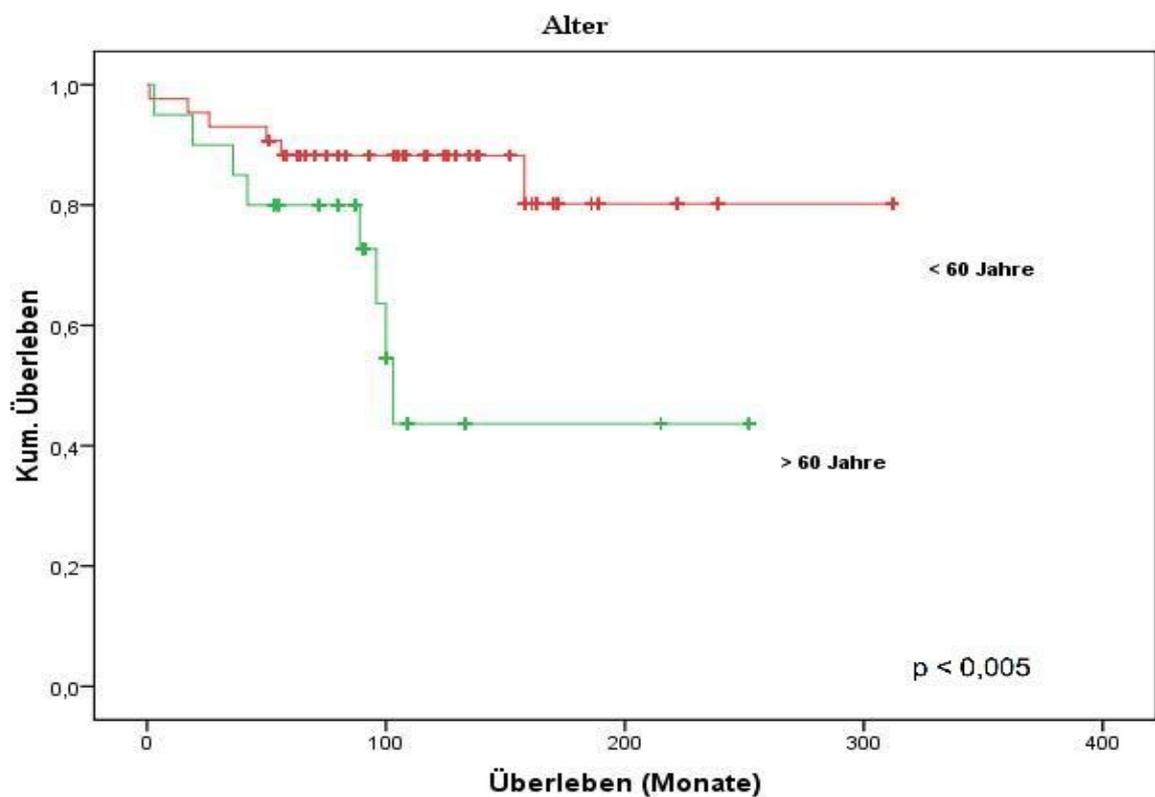


Abbildung 10b. Kaplan-Meier-Überlebenskurven – Alter

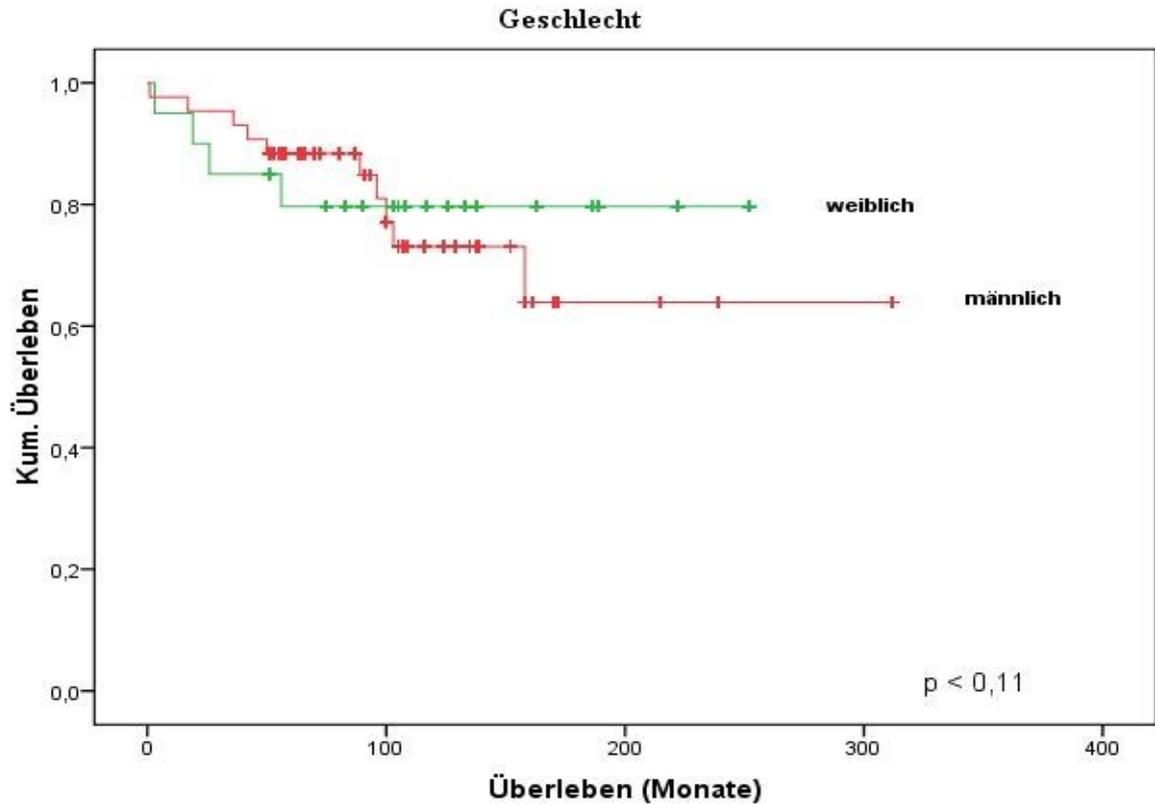


Abbildung 10c. Kaplan-Meier-Überlebenskurven – Geschlecht

Bei der Lokalisation des Primärtumors kann man feststellen, dass die Patienten sich signifikant im Überleben unterscheiden ($p < 0,005$). Das trifft lediglich beim Vergleich von Tumoren lokalisiert im Pankreaskopf und im Pankreasschwanz nicht zu ($p < 0,66$). In absteigender Reihenfolge beträgt das mediane Überleben beim Primärtumor im Pankreasschwanz $>320,4$ Monate ($n=30$), im Pankreaskorpus >200 Monate ($n=14$), im Pankreaskopf 158 Monate ($n=12$) und bei einem diffusen Wachstum 56 Monate ($n=3$) (siehe Abbildung 10d).

Auch beim Vergleich der angewandten OP-Methoden zeigen sich signifikante Unterschiede hinsichtlich des Überlebens. Patienten mit einer subtotalen Pankreatektomie und Pankreaslinksresektion unterscheiden sich signifikant von allen anderen Patienten im Überleben ($p < 0,005$). Weitere signifikante Unterschiede im Überleben zeigen sich zwischen Whipple-OP und Pankreaslinksresektion ($p < 0,005$) bzw. Whipple-OP und Enukektion ($p < 0,02$). Eine statistische Signifikanz verpassen Whipple-OP und Pankreasschwanzresektion ($p < 0,37$), sowie Pankreasschwanzresektion und Enukektion ($p < 0,40$). Das schlechteste Überleben weisen Patienten mit einer subtotalen Pankreatektomie auf, mit einem medianen

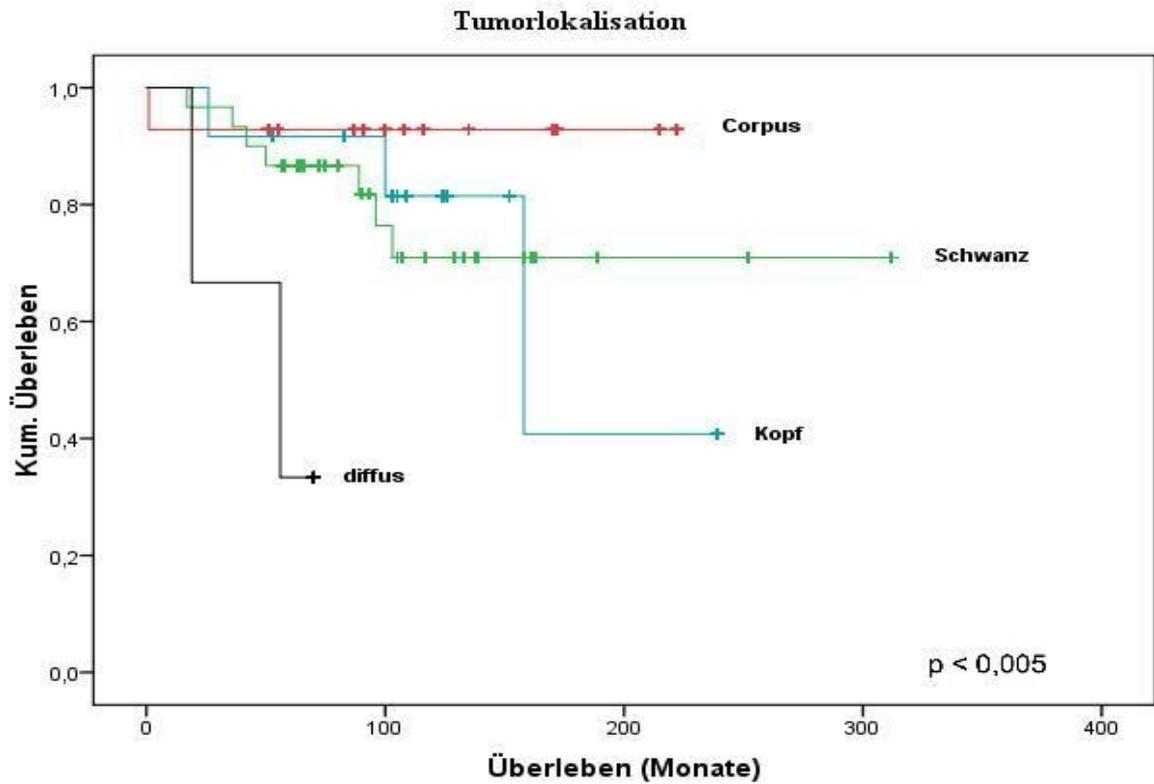


Abbildung 10d. Kaplan-Meier-Überlebenskurven – Tumorlokalisation

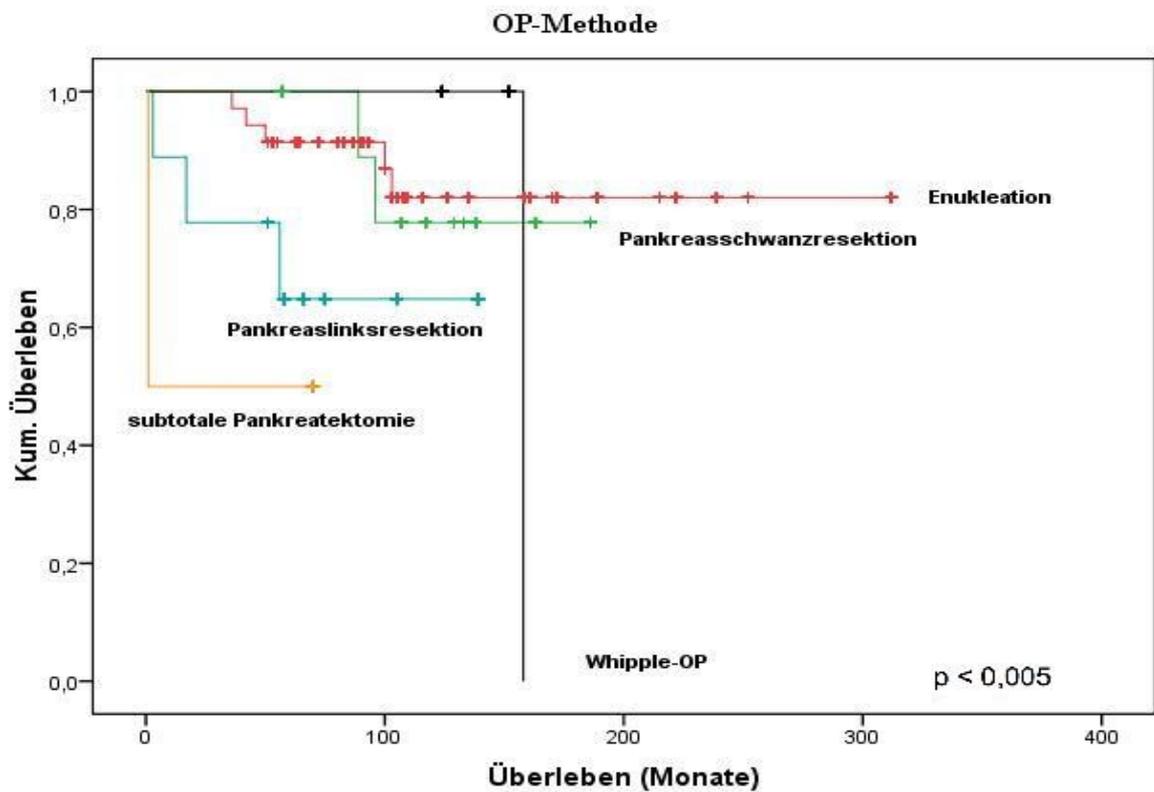


Abbildung 10e. Kaplan-Meier-Überlebenskurven – OP-Methode

Überleben von 1,0 Monat (n=2). Die weiteren OP-Methoden zeigen, in absteigender Reihenfolge ihrer Invasivität, ein medianes Überleben von 158,0 Monaten (Whipple-OP) (n=3), von mindestens 140 Monaten (Pankreaslinksresektion) (n=9), von mindestens 190 Monaten (Pankreasschwanzresektion) (n=10) und von über 320,4 Monaten (Enukleation) (n=35) (siehe Abbildung 10e).

3.3. Histonmodifikationen: Expression

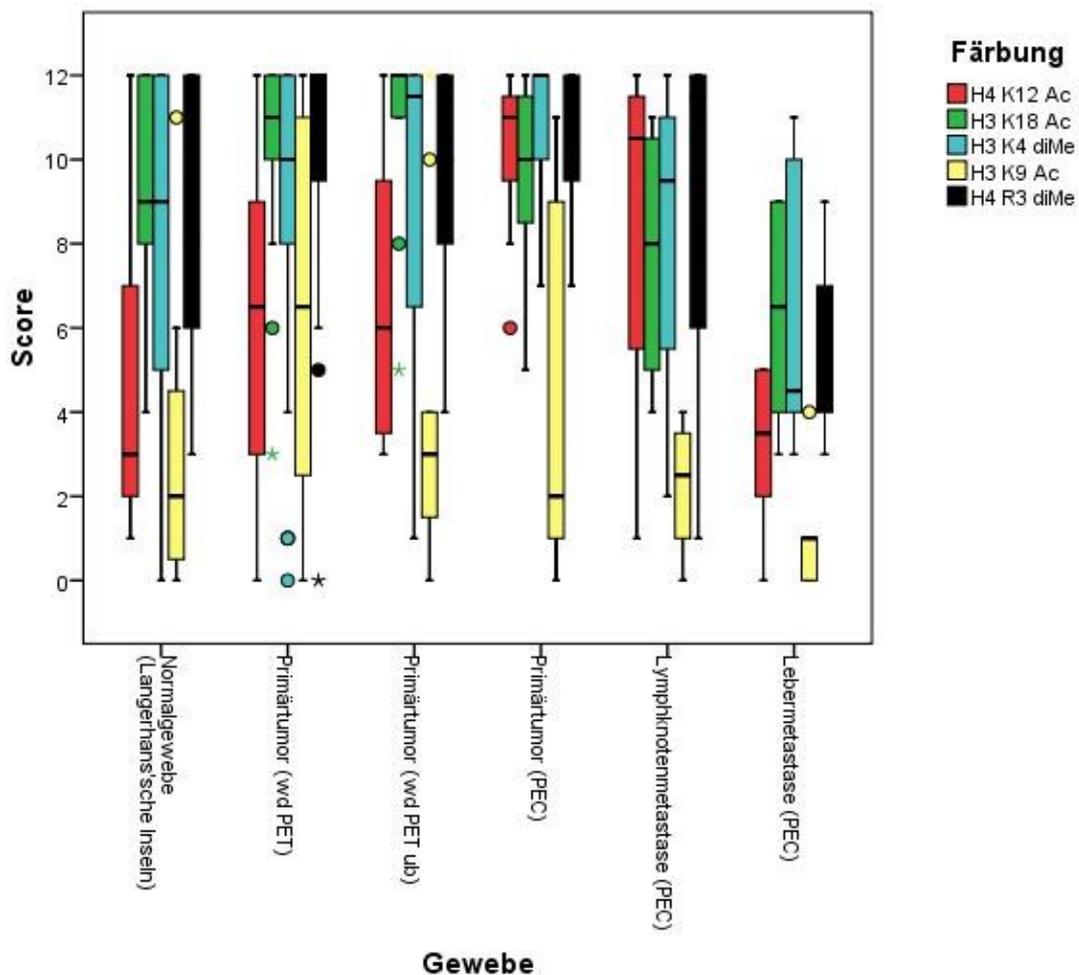


Abbildung 11. Gewebe nach WHO (Score) – Färbeprofil

Im Folgenden wird die Expression der einzelnen Färbungen dargestellt. Dabei stellt die Abbildung 11 das Färbeprofil der einzelnen Gewebe zunächst als Übersicht dar. Sie vereint die Informationen der Abbildungen 12 – 16 und soll trotz der vielen Information Gemeinsamkeiten der Gewebe und Unterschiede zwischen den einzelnen Färbungen veranschaulichen. Beispielsweise kann man erkennen, dass

trotz der Gewebeunterschiede H3 K9 Ac insgesamt schwächer exprimiert ist als die übrigen Färbungen. In den Abbildungen 12 – 16 wird die Expression separat für jede einzelne Färbung dargestellt, damit entsprechend unserer Eingangsfragestellung Gewebsunterschiede aufgezeigt werden können (Normalgewebe: n=15, Primärtumor PET: n=40, Primärtumor PETub: n=12, Primärtumor PEC: n=7, Lymphknotenmetastase PEC: n=4, Lebermetastase PEC: n=6). Gleichzeitig wird der verwendete Färbungsscore (s. Kapitel 2.4.2) mit der Anzahl positiv gefärbter Zellen für jede Färbung einzeln verglichen.

3.3.1. H4 (acetyl K12)

Die Histonfärbung H4 K12 Ac zeigt eine signifikant verschiedene Expression jeweils zwischen malignem Primärtumorgewebe (PEC) und folgenden Geweben: Normalgewebe, Primärtumor (PET), Primärtumor (PETub) und Lebermetastasen (PEC) für die Anzahl positiver Zellen der entsprechenden Gewebe und Normalgewebe und Lebermetastasen für den Expressionsscore (siehe Abbildung 12a / 12b). Der zugehörige p-Wert entspricht der o.g. Reihenfolge entsprechend $p < 0,02$, $p < 0,005$, $p < 0,04$, $p < 0,01$ bei der Anzahl positiver Zellen und $p < 0,02$, $p < 0,01$ beim Score. Die Mittelwerte sind bei der Anzahl positiver Zellen von Normalgewebe zu Primärtumor (PEC) ansteigend, mit 49,53 % (Normalgewebe), 55,75 % (Primärtumor, PET), 63,67 % (Primärtumor, PETub), 85,00 % (Primärtumor, PEC). Bei den Metastasen zeigt sich eine Abnahme des Mittelwerts, mit 72,75 % (Lymphknotenmetastasen, PEC) und 39,50 % (Lebermetastasen, PEC). Den gleichen Verlauf zeigt auch der Score mit folgenden Mittelwerten: 5 (Normalgewebe), 6 (Primärtumor, PET), 7 (Primärtumor, PETub), 10 (Primärtumor, PEC), 9 (Lymphknotenmetastasen, PEC) und 3 (Lebermetastasen, PEC).

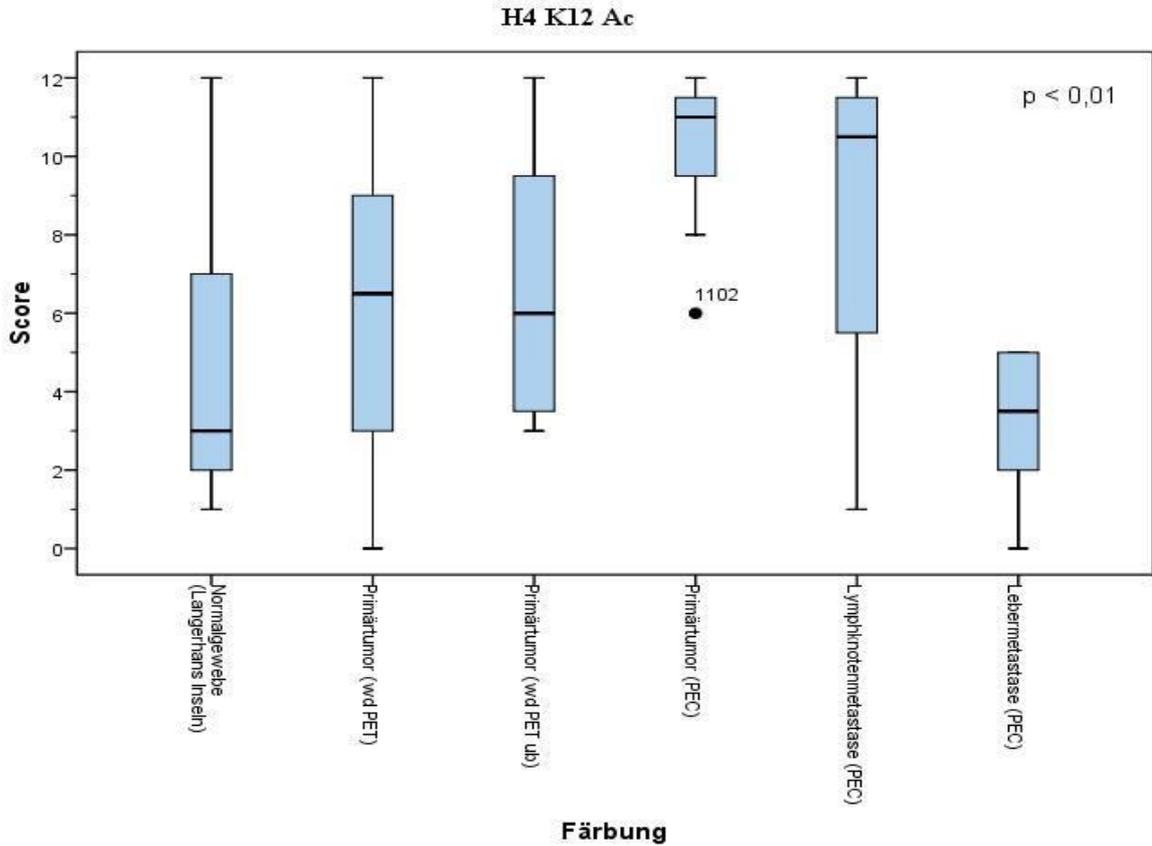


Abbildung 12a. Gewebe nach WHO (Score) – H4K12Ac

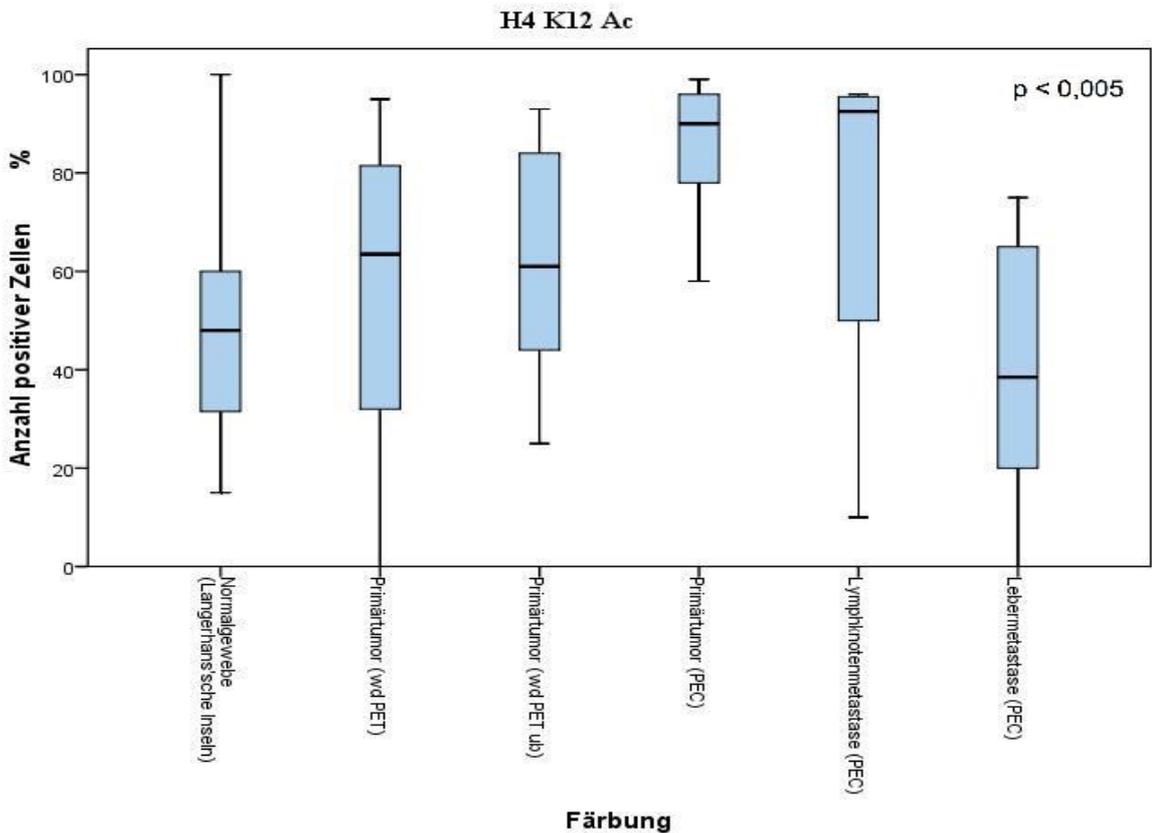


Abbildung 12b. Gewebe nach WHO (Anzahl positiver Zellen) – H4K12Ac

3.3.2. H3 (acetyl K18)

Die Histonfärbung H3 K18 Ac zeigt einen Anstieg der Mittelwerte bei der Anzahl positiver Zellen vom Normalgewebe (83,76 %) zu den benignen Primärtumorgeweben (PET = 89,65 % und PETub = 94,75 %). Ein Abfall der Mittelwerte findet sich bei malignem Primärtumorgewebe (88,57 %), Lymphknotenmetastasen (79,00 %) und Lebermetastasen (71,50 %) (siehe Abbildung 13b). Die gleiche Tendenz zeigt sich auch beim Score mit folgenden Mittelwerten, der o.g. Reihenfolge entsprechend: 9 (Normalgewebe), 11 (PET), 11 (PETub), 10 (PEC), 8 (Lymphknotenmetastasen), 6 (Lebermetastasen) (siehe Abbildung 13a). Statistisch signifikante Unterschiede zeigen sich bei der Anzahl positiver Zellen zwischen Normalgewebe und Primärtumorgewebe (PETub) ($p < 0,02$) sowie beim Score zwischen benignem Primärtumorgewebe (PET bzw. PETub) und Lebermetastasen (jeweils $p < 0,005$).

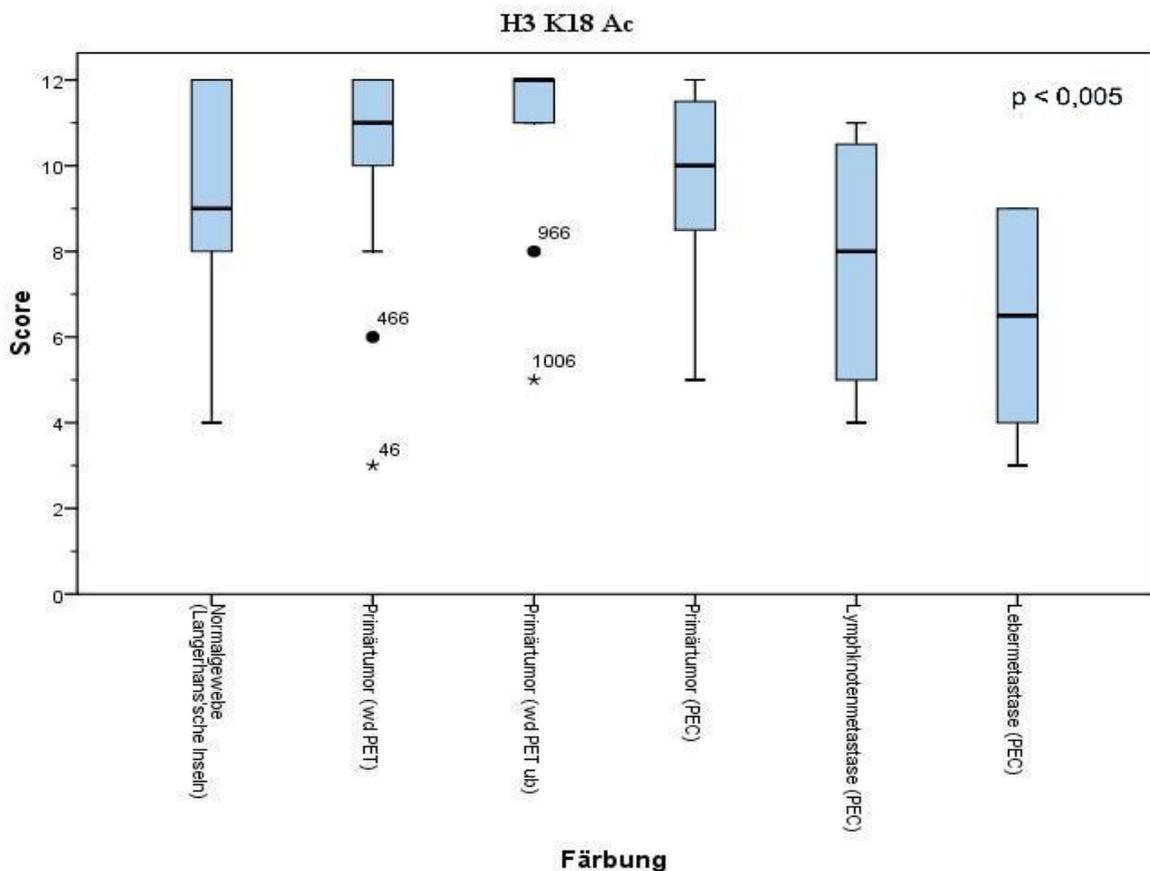


Abbildung 13a. Gewebe nach WHO (Score) – H3K18Ac

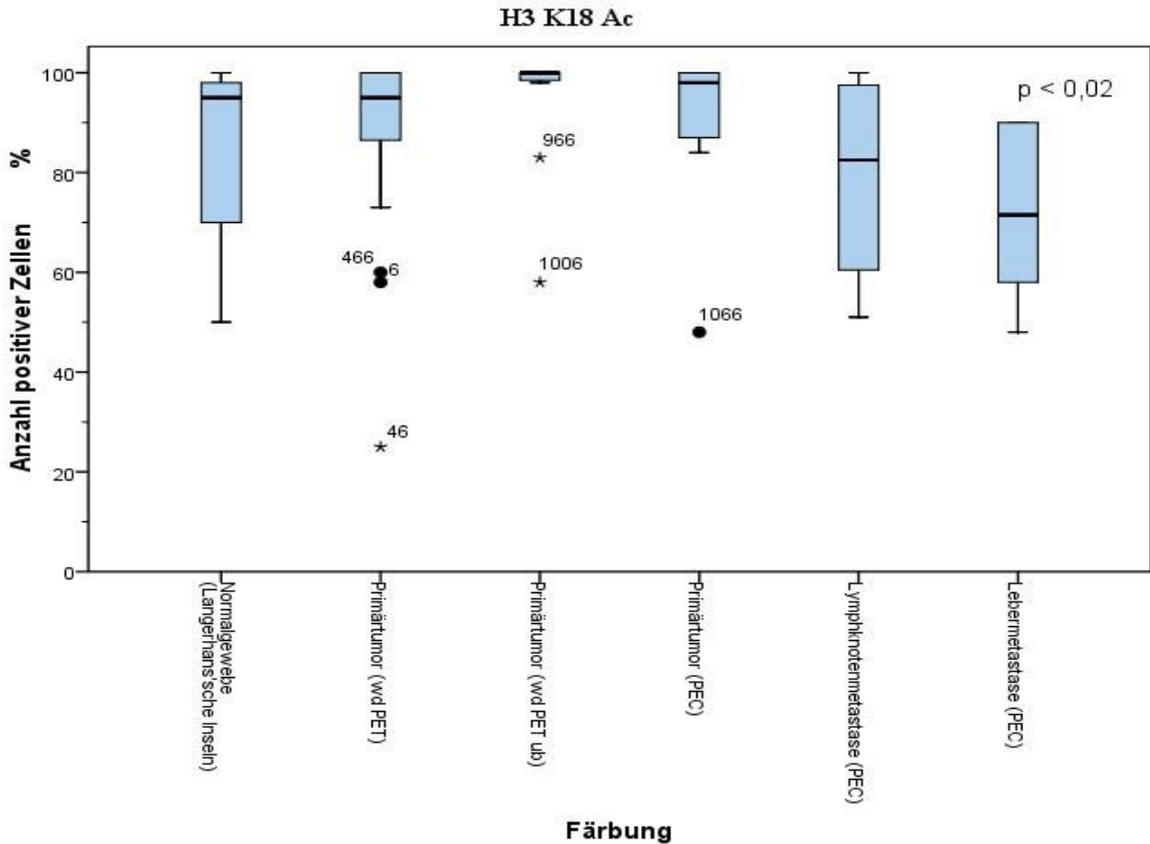


Abbildung 13b. Gewebe nach WHO (Anzahl positiver Zellen) – H3K18Ac

3.3.3. H3 (dimethyl K4)

Bei der Histonfärbung H3 K4 diMe lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Expression zwischen den einzelnen Geweben feststellen – weder bei der Anzahl positiver Zellen, noch beim Score (siehe Abbildung 14a, 14b). Die Mittelwerte bei der Anzahl positiver Zellen bzw. beim Score lauten wie folgt: 74,59 %, 8 (Normalgewebe); 83,25 %, 9 (PET); 82,42 %, 9 (PETub); 94,57 %, 11 (PEC); 74,75 %, 8 (Lymphknotenmetastasen); 69,17 %, 6 (Lebermetastasen).

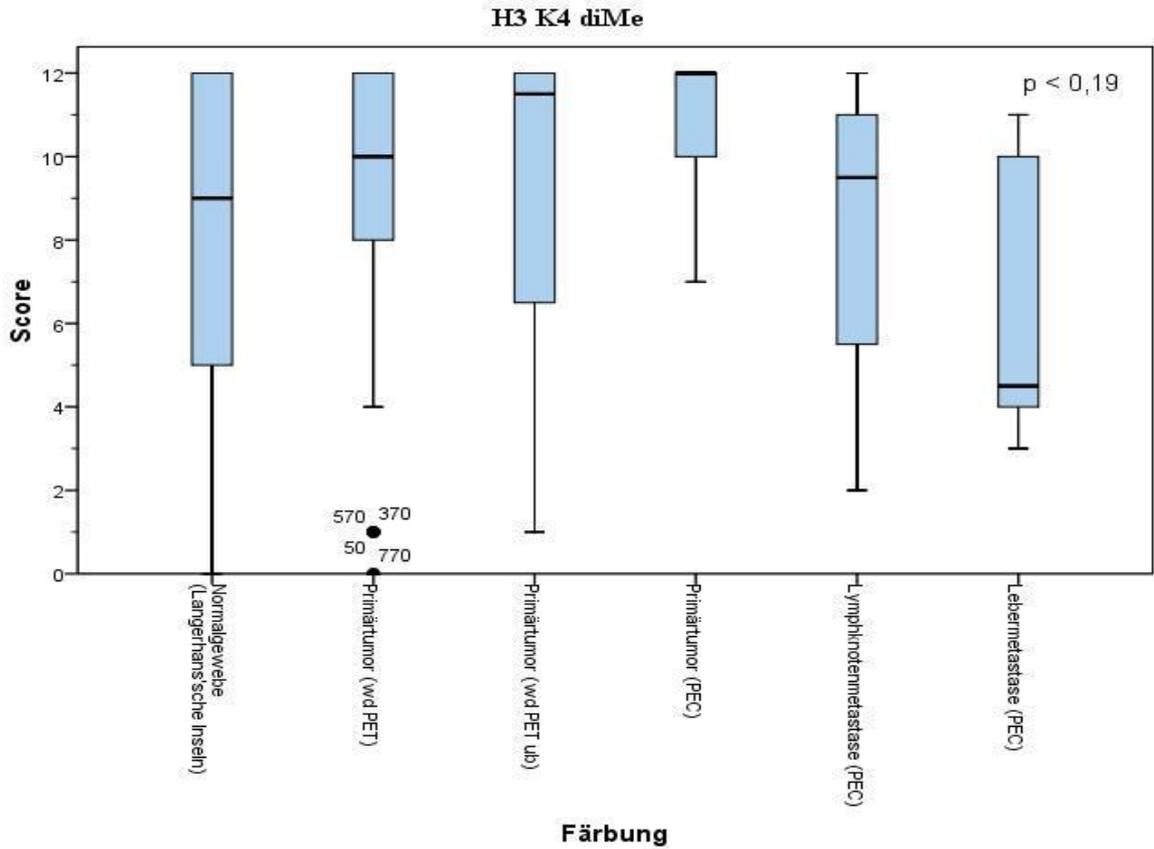


Abbildung 14a. Gewebe nach WHO (Score) – H3K4diMe

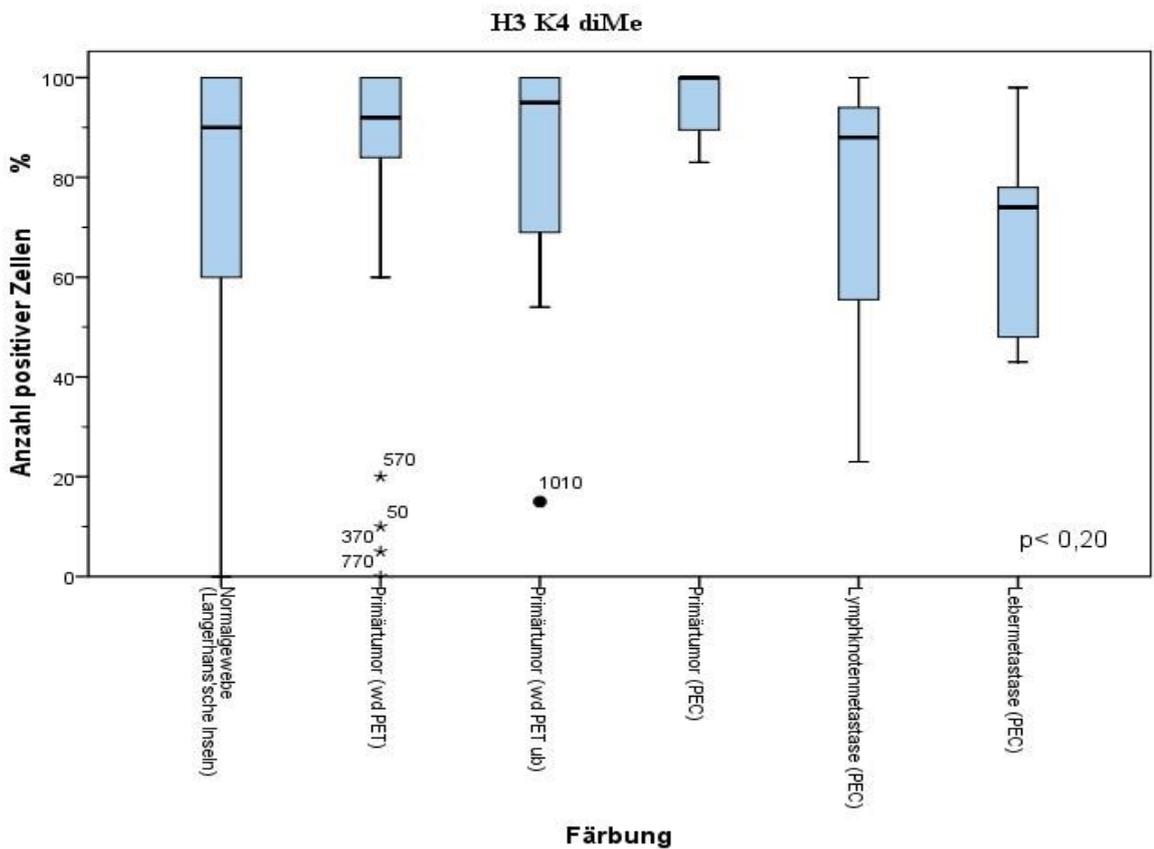


Abbildung 14b. Gewebe nach WHO (Anzahl positiver Zellen) – H3K4diMe

3.3.4. H3 (acetyl K9)

Bei der Histonfärbung H3 K9 Ac lässt sich für das benigne Primärtumorgewebe (PET) im Vergleich zum restlichen Gewebe ein hoher Mittelwert feststellen mit 59,33 % positiver Zellen (siehe Abbildung 15b) und einem Score von 6 (siehe Abbildung 15a). Beide Werte sind statistisch signifikant höher als das Normalgewebe mit 30,73 % positiver Zellen ($p < 0,01$) und einem Score von 3 ($p < 0,04$). Beim Score unterscheiden sich zudem benignes Primärtumorgewebe (PET) und Lebermetastase signifikant ($p < 0,04$). Weitere signifikante Unterschiede finden sich nicht. Die restlichen Mittelwerte für die Anzahl positiver Zellen bzw. für den Score betragen 45,00 % bzw. 4 (Primärtumorgewebe, PETub), 41,43 % bzw. 5 (Primärtumorgewebe, PEC), 31,50 % bzw. 2 (Lymphknotenmetastasen) und 15,17 % bzw. 1 (Lebermetastasen).

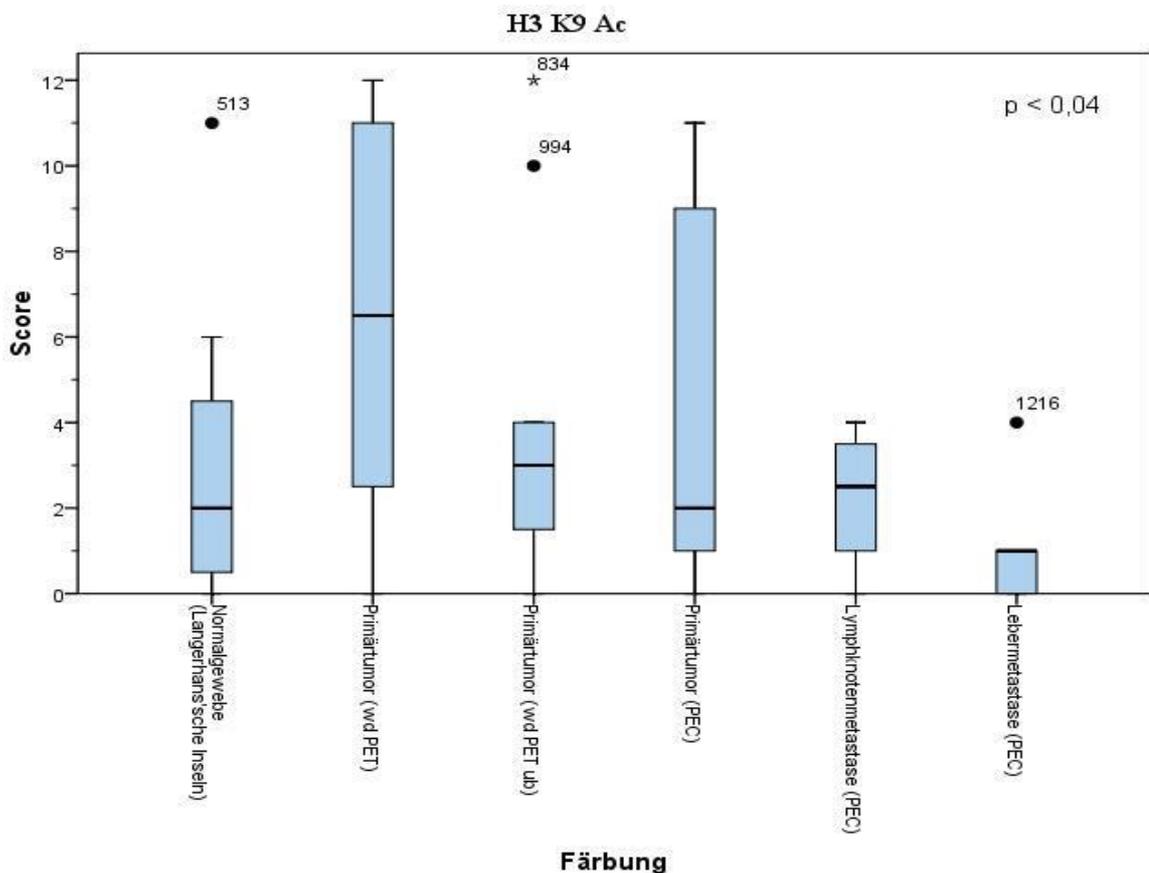


Abbildung 15a. Gewebe nach WHO (Score) – H3K9Ac

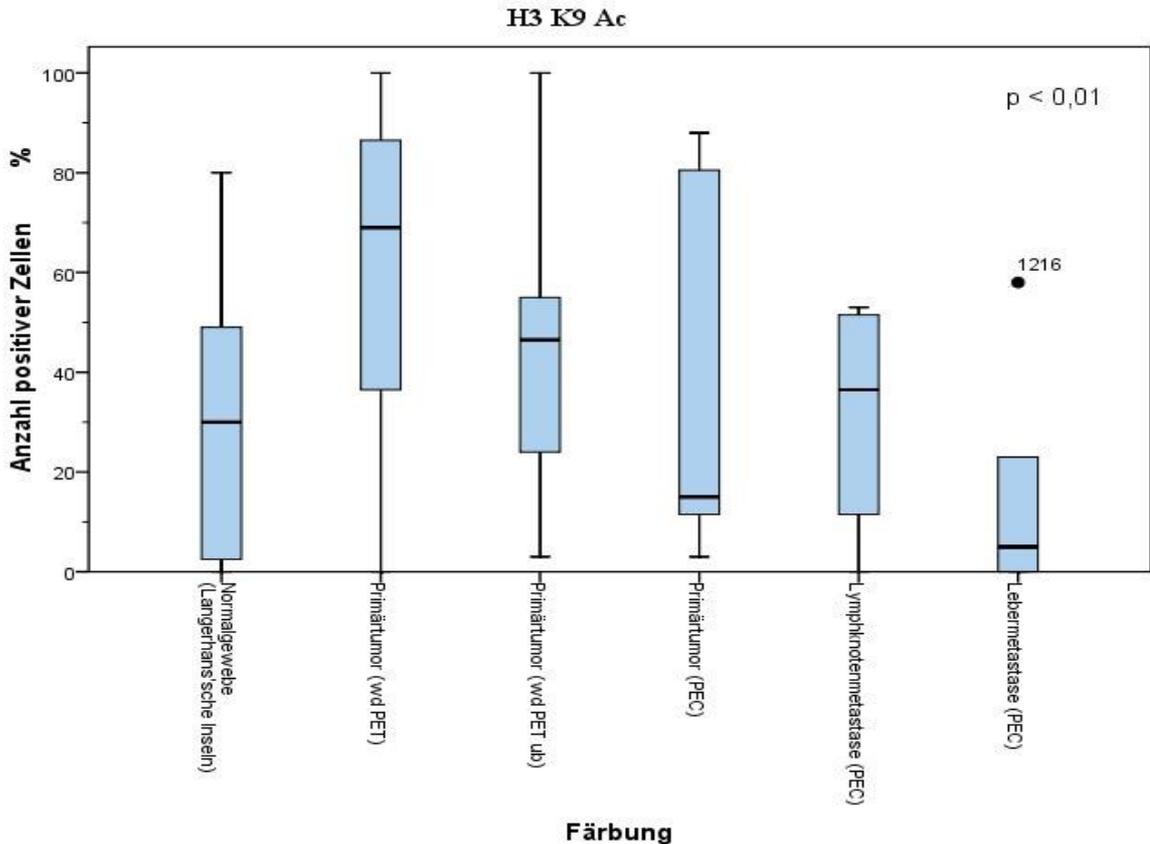


Abbildung 15b. Gewebe nach WHO (Anzahl positiver Zellen) – H3K9Ac

3.3.5. H4 (dimethyl R3(Arg3))

Signifikante Unterschiede bei der Anzahl positiver Zellen finden sich bei der Histonfärbung H4 R3 diMe zwischen Normalgewebe und benignem Primärtumor (PET) ($p < 0,01$) und zwischen malignem Primärtumorgewebe (PEC) und Lebermetastasen ($p < 0,01$). Zudem zeigt sich der Score zwischen Lebermetastasen und Primärtumorgewebe jeweils signifikant unterschiedlich (PET, PETub, PEC) ($p < 0,005$, $p < 0,04$, $p < 0,03$). Es zeigen sich keine weiteren signifikanten Unterschiede. Die Mittelwerte für die Anzahl positiver Zellen (siehe Abbildung 16b) bzw. für den Score (siehe Abbildung 16a) lauten wie folgt: 81,64 % bzw. 8 (Normalgewebe), 90,23 % bzw. 10 (PET), 89,17 % bzw. 10 (PETub), 92,71 % bzw. 10 (PEC), 78,25 % bzw. 9 (Lymphknotenmetastasen), 63,00 % bzw. 6 (Lebermetastasen).

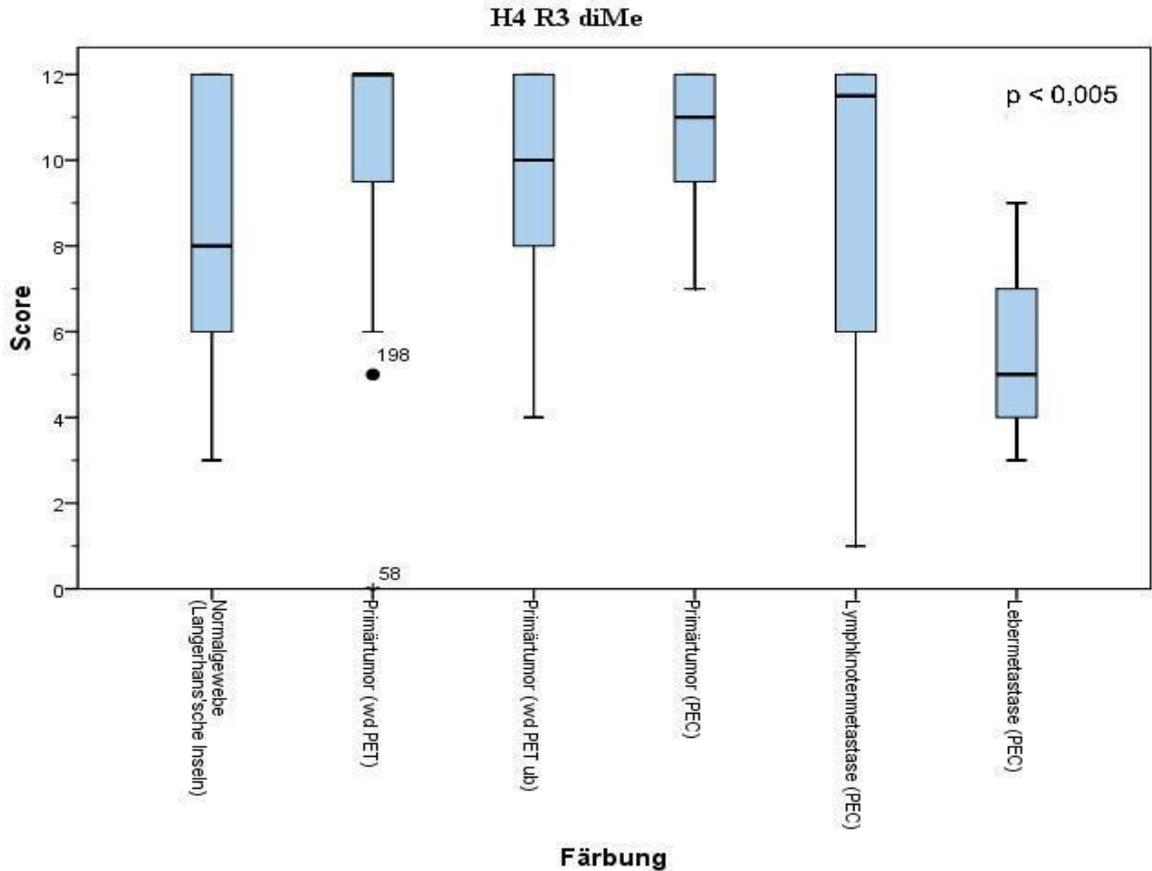


Abbildung 16a. Gewebe nach WHO (Score) – H3R4diMe

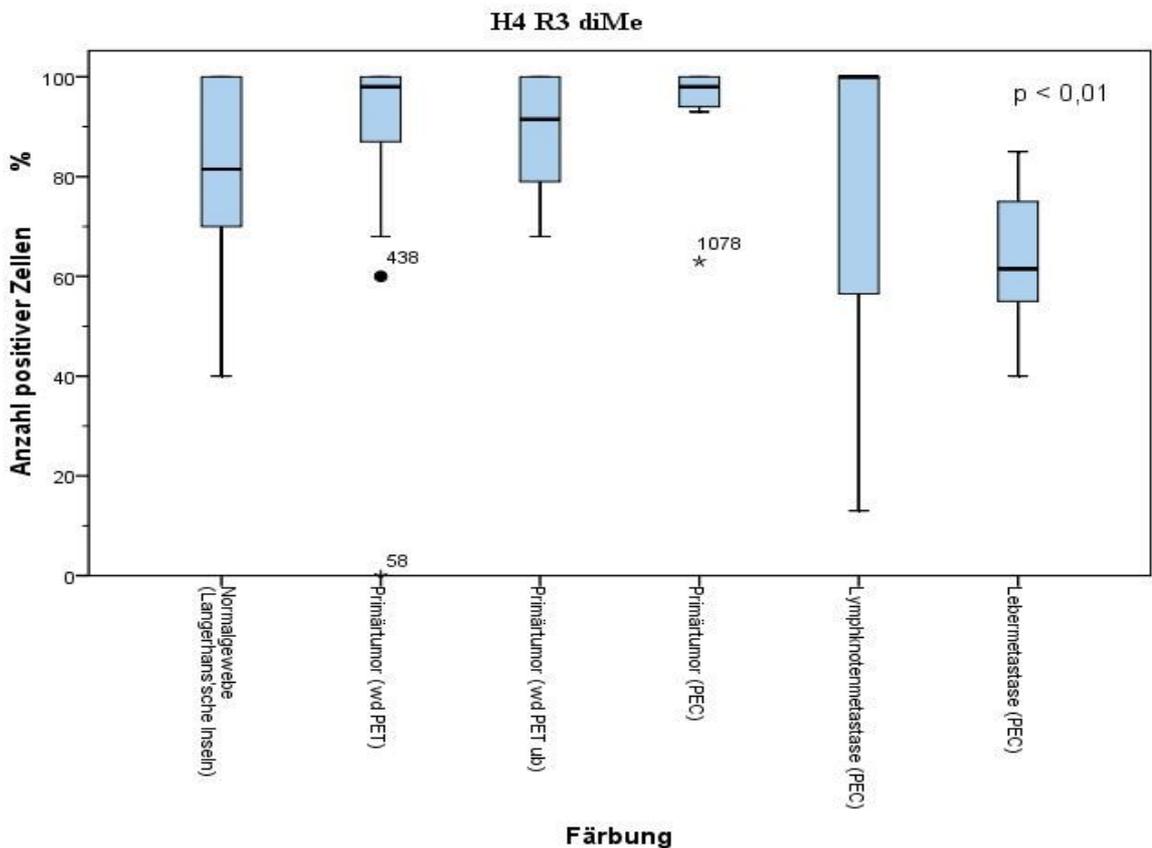


Abbildung 16b. Gewebe nach WHO (Anzahl positiver Zellen) – H3R4diMe

3.4. Histonexpression & Überleben

Bei allen 5 Histonfärbungen wurden Patienten mit unterschiedlichen Expressionsschwellenwerten hinsichtlich ihres Überlebens miteinander verglichen. Dabei zeigten sich nur für jeweils einen Expressionsschwellenwert bei H3 K18 Ac und H3 K9 Ac Patientenkollektive mit signifikant unterschiedlichem durchschnittlichen Überleben (siehe Abbildungen 17 und 18). Dabei wurde lediglich die Histonfärbung der jeweiligen Primärtumorgewebe in der Berechnung berücksichtigt (n=59). Somit wurden Patienten mit ausschliesslich vorliegendem Normal- und Metastasengewebe aus der Berechnung ausgeschlossen (n=4).

Bei der Histonfärbung H3 K18 Ac zeigt sich ein medianes Überleben von 118,8 Monaten bei Patienten mit einem Score <8 (n=4). Patienten mit einem Score ≥ 8 (n=55) weisen ein medianes Überleben von mindestens 263,8 Monaten auf – dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p < 0,04$) (siehe Abbildung 17). Bei der Anzahl positiver Zellen lässt sich kein Schwellenwert mit signifikantem Unterschied feststellen.

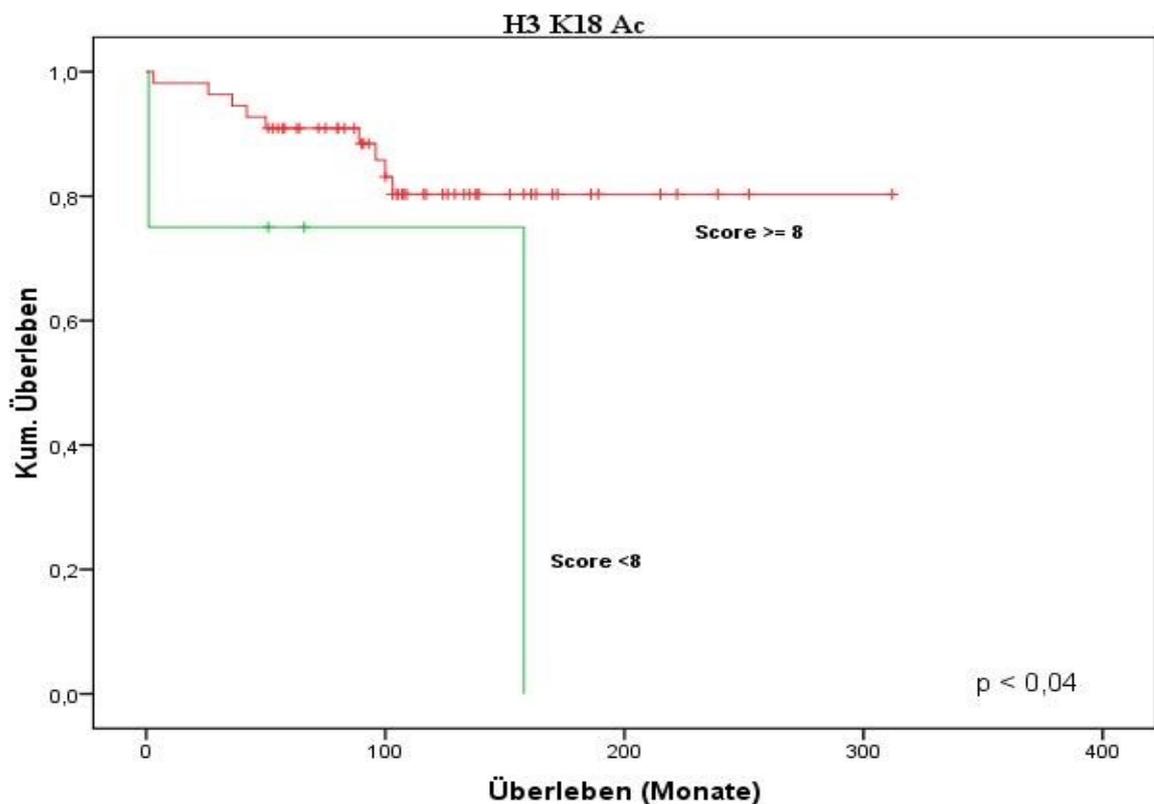


Abbildung 17. Kaplan-Meier-Überlebenskurven – Histonexpression (Score)
H3 K18 Ac

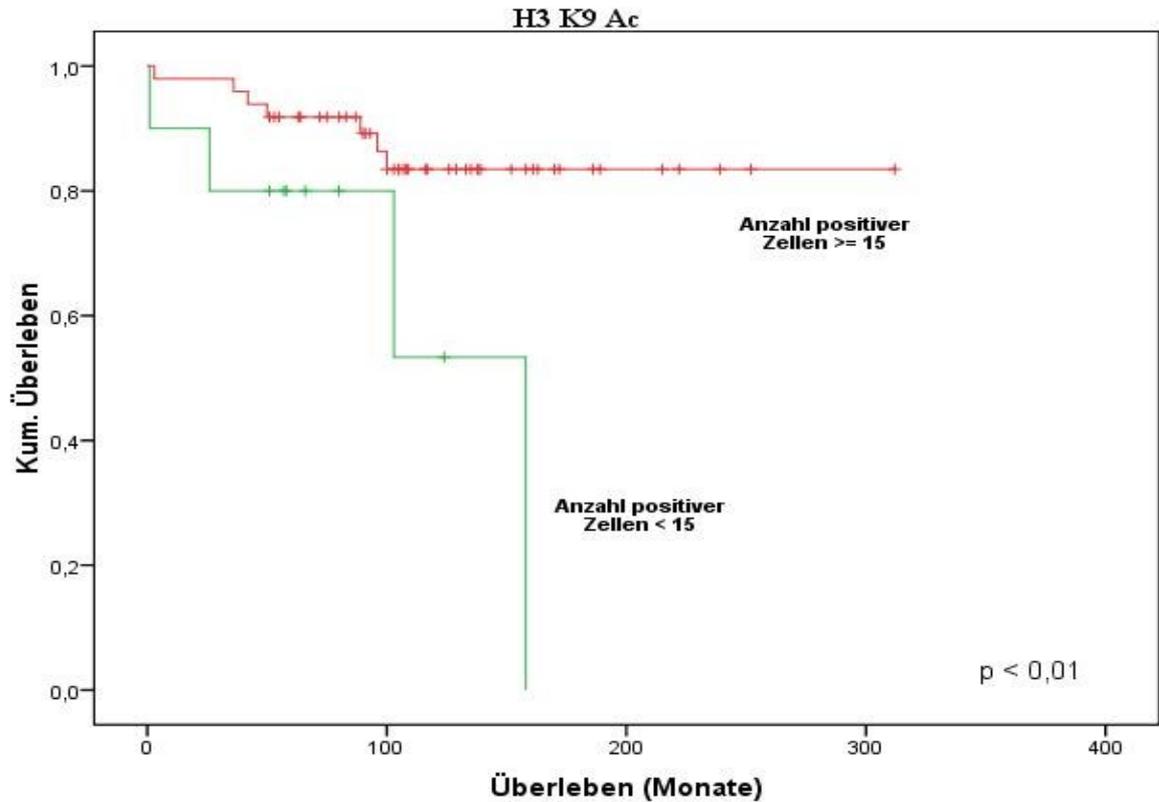


Abbildung 18. Kaplan-Meier-Überlebenskurven – Histonexpression (Anzahl pos. Zellen - %) H3 K9 Ac

Die Histonfärbung H3 K9 Ac zeigt beim Score keinen Schwellenwert mit signifikantem Unterschied. Bei alleiniger Berücksichtigung der Anzahl positiv gefärbter Zellen zeigte sich bei Patienten mit ≥ 15 % positiv gefärbten Zellen ($n=49$) ein medianes Überleben von mindestens 271,0 Monaten – signifikant unterschiedlich zu Patienten mit < 15 % positiv gefärbten Zellen ($n=10$) mit einem medianen Überleben von 114,4 Monaten ($p < 0,01$) (siehe Abbildung 18).

4. Diskussion

4.1. Klinische Daten

4.1.1. Patientenkollektiv

Beim untersuchten Kollektiv gibt es Besonderheiten, die eine Bedeutung für die Aussagekraft der in dieser Arbeit vermittelten Ergebnisse haben. Für eine derart seltene Tumorentität ist die Anzahl der Patienten als relativ groß zu werten. Sie gilt als eine der größten Fallsammlungen national. Zur Untersuchung klinisch relevanter Signifikanzen ist das Kollektiv, den statistischen Methoden geschuldet, jedoch grenzwertig klein. Die Verteilung der jeweiligen Tumorentität (wd PET, wd PETub, PEC) entspricht der bekannten Prävalenz in der Normalbevölkerung, sodass die geringe Patientenzahl sich wieder relativiert. Desweiteren anzumerken ist, dass alle Patienten an der Uniklinik Düsseldorf angebunden waren, sodass es sich um ein regional gebundenes Patientenkollektiv handelt. Beim untersuchten Kollektiv sind nur operierte Patienten eingeschlossen. Damit finden Patienten mit anderen Therapiekonzepten, somit vor allem mutmaßlich Patienten mit einem fortgeschritteneren Krankheitsbild, die nicht in der chirurgischen Klinik geführt wurden, keine Berücksichtigung. Da es bei der Fragestellung, um die Diskussion der Radikalität des u. a. chirurgischen Therapiekonzepts geht und die Tumorverteilung der Normalbevölkerung entspricht, dürfte diese Einschränkung wenig Einfluss auf die Aussagekraft der Ergebnisse haben. Eine lange Beobachtungsdauer stellt ein notwendiges Qualitätsmerkmal für diese seltene Tumorentität dar, die mit durchschnittlich 8,8 Jahren und maximal 26,7 Jahren gewährleistet werden kann.

4.1.2. Outcome

Das Überleben, entsprechend der klinischen Parameter, korreliert erwartungsgemäß mit dem Krankheitsfortschritt. Die Patienten zeigen ein kürzeres Überleben je fortgeschrittener das Krankheitsstadium ist. Bei der WHO-Klassifikation sind diese Unterschiede signifikant. Bei der TNM-Klassifikation sind zwei Gruppen nicht repräsentiert, was zumindest die Frage nach ihrer Bedeutung aufwirft. Möglicherweise ist eine Einteilung der Stadien II und III beim Insulinom in IIa, IIb und

IIIa, IIIb nicht angebracht bzw. klinisch und prognostisch nicht relevant unterschiedlich. Oder anders formuliert tritt eine Diskrepanz zwischen ausgeprägtem Tumorlokalbefund (T3-4) und fehlender logoregionaler Metastasierung (N0) selten auf und ist in unserem Kollektiv nicht vertreten. Trotz dieser Einschränkung lässt sich bei der TNM-Klassifikation eine stete Verschlechterung des Überlebens mit dem Fortschreiten des Krankheitsstadiums feststellen. Patienten mit einem Rezidiv zeigen wie erwartet ein signifikant schlechteres Überleben. Hervorzuheben ist, dass dieser Unterschied trotz der inhomogenen Rezidivgruppe besteht, denn es sind nicht ausschließlich Patienten mit einem malignen Tumor, sondern auch Patienten mit einem benignen Tumor vertreten. Ältere Patienten unseres Kollektivs zeigen ein signifikant kürzeres Tumorüberleben. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied war nicht feststellbar. Bei der Tumorlokalisation zeigt sich ein Überlebensvorteil für Tumore im Pankreasschwanz. Dieser Überlebensvorteil spiegelt sich auch in der entsprechenden OP-Methode einer Pankreasschwanzresektion wider. Einzig die Enukleation zeigt erwartungsgemäß, da es bei kleinen oberflächlich gelegenen und ausschließlich benignen Tumoren durchgeführt werden kann, ein besseres Überleben. Insulinome im Pankreaskorpus oder –kopf erfordern zumeist invasivere OP-Methoden. Erwartungsgemäß ist daher ihre Prognose schlechter als für im Pankreasschwanz gelegene Insulinome. Wie erwartet zeigen Insulinome mit lokal diffusem Wachstumsmuster und subtotale Pankreatektomien jeweils die schlechteste Prognose. Die Aussagekraft hinsichtlich der subtotalen Pankreatektomien ist bei der geringen Anzahl (n=3) eingeschränkt und lässt lediglich die Wertung als Trend zu. Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass je fortgeschrittener das Tumorstadium ist, das Überleben umso kürzer ausfällt. Durch das fortgeschrittene Tumorstadium muss letztendlich auch die OP invasiver ausfallen. Somit zeigen invasivere OP-Methoden eine schlechtere Prognose.

Während der Erstellung dieser Arbeit wurde 2010 bereits eine neue Nomenklatur und Klassifikation der Neuroendokrinen Tumore des Gastrointestinaltrakts im Auftrag der WHO veröffentlicht [84]. Zunächst wurde der Begriff „endokrin“ durch „neuroendokrin“ ersetzt, um die Expression neuroendokriner Marker wie beispielsweise des Synaptophysins zu verdeutlichen. Weiterhin wurde ein neuer Begriff der „Neuroendokrinen Neoplasie“ (NEN) eingeführt. Dieser soll als Oberbegriff für gutartige und bösartige Tumore dienen. Desweiteren wurde eine

Grading-Einteilung beschrieben, die entsprechend der 2004 vorgeschriebenen Proliferationsrate eine Unterteilung in G1 bis G3 vornimmt. Die Unterscheidung zwischen Tumoren mit geringem Proliferationsindex (< 2 % Ki-67/MiB-1 positive Zellen), entsprechend WHO 1A von 2004, und hohem Proliferationsindex (> 2 % Ki-67/MiB-1 positive Zellen), entsprechend WHO 1B von 2004, wurde um eine dritte Gruppe mit sehr hohem Proliferationsindex (> 20 % Ki-67/ MiB-1 positive Zellen) erweitert. Als Hauptgruppen werden Neuroendokrine Tumore, NET (G1, G2), von Neuroendokrinen Karzinomen, NEC (G3), unterschieden. Anders als in der WHO Klassifikation von 2004 steht der Proliferationsindex und somit das *Grading* im Vordergrund. Die Bezeichnung Tumor oder Karzinom fällt daher unabhängig von der vorliegenden Metastasierung. Diese Unterteilung trägt der Tatsache Rechnung, dass relevante prognostische Merkmale bereits in der vorliegenden TNM-Klassifikation hinreichend beschrieben sind. Die WHO-Klassifikation erfüllt in ihrer Fassung von 2010 vielmehr die Aufgabe einheitliche Bezeichnungen einzuführen und durch die Übernahme des *Grading*-Systems, die in dieser Form bereits in der TNM-Klassifikation beschrieben ist, nunmehr lediglich die TNM-Stadieneinteilung zu ergänzen. Dadurch stehen aktuell die TNM-Klassifikation zur Beschreibung der logoregionalen Ausdehnung und ergänzend die WHO-Klassifikation mit ihrem prognostisch relevanten *Grading* zur Einteilung neuroendokriner Tumore zur Verfügung. Da diese Klassifikation erst nach Abschluss der in dieser Arbeit erfolgten Laborarbeiten publiziert wurde, fand sie keine Anwendung in der Datenauswertung.

4.2. *Histonmodifikationen*

4.2.1. *Expressionsmuster der Insulinome*

Beim Vergleich der Gewebe zeigen alle Färbungen bis auf H3 K4 diMe signifikante Unterschiede. Für die Färbungen H4 K12 Ac und H3 K9 Ac besteht eine klinische Relevanz, da die Expression ein zusätzlicher Kontrollparameter sein kann, um benigne Insulinome gegenüber Normalgewebe zu unterscheiden. Diese Unterschiede sind bei der Expression von H4 K12 Ac nur bei der Anzahl der positiven Zellen zu verzeichnen, während H3 K9 Ac eine Signifikanz bei der Anzahl positiver Zellen und beim Score zeigt. Keine Expression kann eine signifikante Unterscheidung von benignen und malignen Insulinomen gewährleisten.

Betrachtet man die Ergebnisse bei den Survivalanalysen der Histonexpression, so sieht man bei H3 K18 Ac und H3 K9 Ac ab einem bestimmten Schwellenwert ein signifikant besseres Überleben für das jeweils stärker exprimierende Kollektiv (s. Abb. 17 und 18). Es gilt zu berücksichtigen, dass im klinischen Alltag nach Diagnose eines Insulinoms nicht in jedem Fall Gewebeproben von Normalgewebe, Primarius und Metastase vorliegen. Die Aussage zur Prognose soll alleine aus den Ergebnissen des Primärtumors erfolgen können. Aus diesem Grund erfolgte eine Suche nach signifikanten Unterschieden bei alleiniger Berücksichtigung des Primärtumors. Vergleicht man die Aussagekraft der Anzahl positiver Zellen und des Expressionsscores, findet man unterschiedliche Aussagen. Bei H3 K18 Ac zeigt nur der Expressionsscore, d.h. eine Beurteilung zusammengesetzt aus Expressionsstärke und Anzahl positiver Zellen, einen signifikanten Schwellenwert. Passend zur Einteilung nach Mosashvili et al, welche drei Untergruppen definiert mit der Bezeichnung „high“ (Score: 8-12), „moderate“ (Score: 4-7) und „low“ (Score: 0-3), ist der Schwellenwert bei einem Score von 8 und zeigt ein signifikant längeres Überleben für die „high“ Untergruppe [83]. Die Anzahl positiver Zellen alleine zeigt keine signifikanten Unterschiede für die Färbung H3 K18 Ac. Bei H3 K9 Ac zeigt sich ein gegensätzliches Bild. Der Expressionsscore weist keinen Mehrwert gegenüber der alleinigen Bestimmung der Anzahl positiver Zellen auf. Hier findet man lediglich einen signifikanten Schwellenwert für das Überleben bei der Anzahl positiver Zellen $\geq 15\%$. Eine Möglichkeit diese scheinbar gegensätzlichen Aussagen zu erklären ist das relativ kleine Kollektiv. Da ist denkbar, dass ein Gruppieren von Ergebnissen Anzahl positiver Zellen, wie sie bei der Erstellung des Expressionsscores erfolgt, einen knappen signifikanten Schwellenwert nicht mehr darzustellen vermag. Die Färbung H3 K9 Ac zeigt, dass die Anzahl positiver Zellen einen besonderen Stellenwert haben kann und auch ohne Berücksichtigung der Expressionsstärke signifikante Unterschiede aufzeigen kann. Dies ist methodisch möglicherweise dadurch erklärbar, dass bereits eine hohe Gesamtzahl von Histonmodifikationen notwendig ist, damit Zellen in der immunhistochemischen Färbung sich positiv färben. Eventuell ist daher die Unterscheidung von schwach positiv zu stark positiv, entsprechend der Bestimmung der Expressionsstärke, weniger entscheidend als die Unterscheidung von positiv zu negativ, entsprechend der alleinigen Bestimmung der Anzahl positiver Zellen. Dennoch scheint die Expressionsstärke ebenfalls eine

Bedeutung zu haben, da ohne ihre Berücksichtigung in Form des Expressionsscore bei der Färbung H3 K18 Ac keine Signifikanzen zu finden wären. Zusammenfassend kann man insbesondere für kleine zu untersuchende Patientenkollektive empfehlen zum kombinierten Expressionsscore zusätzlich die Anzahl positiver Zellen und die Expressionsstärke getrennt zu berücksichtigen, um keine Trends oder Signifikanzen zu übersehen.

4.2.2. Tumorrelevanz

Ausschlaggebend für die hier durchgeführte Arbeit und zur Entscheidung der relevanten, zu untersuchenden Histonmodifikationen war eine 2005 durchgeführte Untersuchung beim Prostatakarzinom. Untersucht wurde eine Acetylierung an H3 K9, H3 K18 und H4 K12 und eine Dimethylierung an H3 K4 und H4 R3. Dabei konnten Histonmodifikationen als unabhängige Prognosemarker für den klinischen Verlauf der Tumorerkrankung gefunden werden. Diese nehmen jeweils Einfluss auf das Rezidivrisiko, und zwar unabhängig vom Tumorstadium, vom präoperativen PSA-Wert (Prostata-spezifisches Antigen) oder vom invasiven Tumorwachstum. Low-grade Prostatakarzinome zeigten entsprechend ihrem Modifikationsniveau an bereits genannten Positionen der Histone H3 und H4 zwei Subgruppen. Diese unterschieden sich signifikant in der Wahrscheinlichkeit, mit dem der Tumor, nach operativer Entfernung des Primärherdes, wiederkehrt [79]. Zwischenzeitlich wurde dieser Untersuchungsansatz auch an anderen Tumorentitäten angewandt. Prognostische Relevanz erlangten eine Dimethylierung am Lysin 4 des Histons H3 (H3 K4 diMe) und eine Acetylierung am Lysin 18 des Histons H3 (H3 K18 Ac) bei Tumoren der Niere, Lunge und Prostata, sowie eine Dimethylierung am Lysin 9 des Histons H3 (H3 K9 diMe) bei Tumoren der Niere und Prostata [85]. Eine reduzierte Acetylierung am Lysin 16 des Histons H4 (H4 K16 Ac) konnte bei Mammakarzinomen gefunden werden [86]. Bei Gliomen zeigte sich eine schlechtere Prognose bei reduzierter Expression von H3 K9 Ac, H3 K4 diMe, H3 K18 Ac, H4 K20 triMe [87]. Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom konnten prognostisch relevante Unterschiede an H3 K4 diMe, H3 K9 Ac und H2A K5 Ac nachgewiesen werden [88]. Desweiteren wurde eine ausgeprägte Trimethylierung am Lysin 9 des Histons H3 (H3 K9 triMe) beim Adenokarzinom des Magens als prognostisch

ungünstig, sowie eine reduzierte Trimethylierung am Lysin 27 des Histons H3 (H3 K27 triMe) und Acetylierung am Lysin 18 des Histons H3 (H3 K18 Ac) als prognostisch günstig gezeigt [89, 90].

Außer der Beschreibung des globalen Histonmodifikationsmusters verschiedener Tumorentitäten sind bereits Zusammenhänge zwischen Histonmodifikationen und der Tumorgenese beschrieben. Beispielsweise ist eine erniedrigte Aktivität oder ein erweitertes Substratspektrum der Histonacetyltransferasen (HATs) durch Mutationen verantwortlich für die Entwicklung vieler Leukämien und malignen Entartungen hämatopoetischer Zellen [91]. HAT-Enzyme sind für eine erhöhte Transkriptionsaktivität verantwortlich. Da dies auch insbesondere für die Transkription des Tumorsuppressorgens p53 gilt, werden HATs ihrerseits als Tumorsuppressoren angesehen [92, 93]. Der Genbereich p300, der für eine bestimmte Untergruppe von HAT-Enzymen codiert, hat eine besondere Bedeutung für epitheliale Tumore, wie beispielsweise für Brusttumoren und Tumoren des Gastrointestinaltraktes [94]. Für ihre natürlichen Gegenspieler, den HDACs, bestehen zwei Theorien in Bezug auf ihre Tumorrelevanz. Einerseits bewirken sie eine erniedrigte Transkriptionsrate des p53-Gens und können durch die verminderte p53 Aktivität einen Tumor zur Folge haben [95]. Andererseits können sie, unterstützend zur Funktion der Tumorsuppressorgene p53 und RB, Genbereiche, die Tumore verursachen, supprimieren [96, 97]. Ob und inwieweit die zweite Aussage von Bedeutung ist, ist unklar, denn eine erhöhte Aktivität der HDAC-Enzyme hat in vivo und in vitro eine erhöhte Tumorzahrscheinlichkeit zur Folge. Dies steht auch im Einklang mit der Feststellung, dass HDAC-Inhibitoren in Tumorzellen regelhaft ein Wachstumsstopp und eine Apoptose bewirken [98]. Dieser Befund wird bereits in der Behandlung von Tumoren ausgenutzt, indem z. B. das Zink-Molekül im Aktivitätszentrum der Histondeacetylasen als Angriffspunkt für Inhibitoren dient. Dem Arginin als Methylierungsort wird ebenfalls eine wichtige Rolle als Regulator von Tumorsuppressor-Genen zugesprochen. Enzymkomplexe wie das PRMT1 und CARM1/ PRMT4 führen parallel zu den Histonacetyltransferasen zu einer vermehrten Transkription des Tumorsuppressors p53. Das PRMT5 Enzym hingegen ist ein Repressor jener Transkription [92, 93]. Desweiteren stellen eine Deacetylierung an H3 K16 und der Verlust einer Trimethylierung an H3 K20 wichtige Schritte bei der Tumorentstehung dar [99]. Eine Trimethylierung am Lysin 27 des

Histons H3 (H3 K27) durch das Enzym EZH2 Methyltransferase ist als Mechanismus beschrieben, die Expression von Tumorsuppressorgenen unabhängig von der DNA-Methylierung an Promotoren zu hemmen [100]. Am korrespondierenden Gen des antagonisierenden Enzyms UTX-Demethylase sind zudem Mutationen in Tumorzellen beschrieben. Durch Hinzufügen funktionstüchtiger, unmutierter UTX-Demethylase in diesen Tumorzellen konnte ein Verlangsamen des Tumorwachstums gezeigt werden [101]. Eine übermäßige Trimethylierung an H3 K27 ist mit einer schlechten Prognose bei Prostata- und Mammakarzinomen vergesellschaftet [102, 103].

Durch Modifikationen an Histonen werden viele verschiedene Zellprozesse gesteuert, nicht nur in Tumor-, sondern auch in Normalgewebe. Trotz ihrer Bedeutung ist noch nicht abschließend geklärt, wie die Information des histone codes auf Nachkommen übertragen wird. Es gibt lediglich erste Hinweise, dass H3/H4 Heterodimere bei der Gametogenese auf die beiden Tochterstränge verteilt werden [104]. Exemplarisch für Bedeutung der Histone bei Zellprozessen seien hier Modifikationen an Histon H3 K4 und Histon H3 K9 genannt. Eine Methylierung am Lysin 4 des H3 Histons (H3 K4) führt zu Euchromatin und dadurch zu einer vermehrten Transkriptionsrate [105, 106]. Der Methylierungszustand an H3 K4 hat zudem scheinbar entscheidenden Einfluss auf die Regulation von Promotoren. Eine Demethylierung an dieser Stelle gilt als einer der ersten Schritte, die zu einer Transkriptionsrepression führen und das zeitlich noch vor einer DNA-Methylierung [80]. Das Lysin 9 am Histon H3 (H3 K9) hingegen ist ein wichtiger repressiver Marker. Es trägt zur Heterochromatisierung bei und spielt eine wesentliche Rolle bei der Inaktivierung des X-Chromosoms [107-109]. Dies erklärt, warum eine einfache Sicht auf die Bedeutung der Histone für die Tumorgenese sich als schwierig erweist. Es ist anhand der aktuellen Literatur wenig wahrscheinlich, dass eine Histonmodifikation beschrieben wird, die alleinverantwortlich für eine Tumorentstehung ist. Vielmehr kann man die Histonmodifikationen aktuell in dem sehr komplexen Gesamtbild der Zellprozesse als einen weiteren Ansatz ansehen, Unterschiede zwischen Tumor- und Normalgewebe aufzuzeigen und die Entstehung von Tumoren besser zu verstehen. Aktuelle Arbeiten liefern bisher eine Beschreibung der Histonexpression der jeweiligen Tumorentitäten mit ihrer möglichen prognostischen Bedeutung. Eine Übersetzung in den klinischen Alltag mit Umsetzung bzw. Anpassung der Therapie abhängig der Histonmodifikationen ist

noch nicht erfolgt. Dies sollte jedoch der Anspruch für die kommenden Forschungsarbeiten sein, indem man beispielsweise bei den jeweiligen Tumorentitäten spezielle Untergruppen untersucht, die eine therapeutische Herausforderung bedeuten, wenn z. B. aktuell durchgeführte Therapien nicht den gewünschten Erfolg zeigen. Ganz konkret könnte man sich eine therapeutische Bedeutung vorstellen für HDAC-Inhibitoren bei Tumoren, die unzureichend chemosensibel oder strahlensensibel sind bzw. wäre eine Untersuchungen mit dieser Fragestellung interessant.

4.3. Resümee

Zusammenfassend sieht man, ähnlich vorbeschriebener Zusammenhänge anderer Tumorentitäten, auch beim Insulinom prognoserelevante Unterschiede beim globalen Histonmodifikationsmuster. Um die Umsetzung in den klinischen Alltag zu vereinfachen, sollte bei der histologischen Erstdiagnose des Primärtumors die Expression der Acetylierung am Lysin 9 des Histons H3 (H3 K9 Ac) bestimmt werden, um zu überprüfen, ob bei mehr als 15 % positiver Zellen eine bessere Prognose zu finden und eine Konsequenz beim therapeutischen Ansatz zu ziehen ist. Für eine einfachere Zellzählung im Klinikalltag, wäre eine Bestimmung, ob mehr als jede sechste Zelle gefärbt ist ($>16,67\%$), möglich. Dies gilt ebenfalls für die Bestimmung des Expressionsscores für die Acetylierung am Lysin 18 des Histons H3 (H3 K18 Ac). Hier ist eine Unterscheidung in zwei Gruppen „high“ (Score ≥ 8) und „moderate/low“ (Score < 8) sinnvoll, um eine prognoserelevante Aussage treffen zu können, wobei für die Gruppe mit dem höheren Expressionsscore mit einer besseren Prognose zu rechnen wäre. Es gilt überdies zu prüfen, ob die prognostisch relevante neue Einteilung der Insulinome nach der WHO Klassifikation 2010 auch durch die Bestimmung der Histonmodifikationen möglich ist.

Allgemein zu dem Thema Histonmodifikationen und ihrem immunhistologischen Nachweis lässt sich sagen, dass viel Potential für zukünftige Untersuchungen vorhanden ist, die aus der großen Anzahl neuer prognoserelevanter Histonmodifikationen und regelmäßig neuer Erkenntnisse grundlegender Zusammenhänge von Histonveränderungen und Zellprozessen resultieren. Bei sehr

seltene Tumorentitäten, wie den Insulinomen, hat alleine der deskriptive Ansatz der Histonmodifikationen eine große Bedeutung. Bei häufigen Tumorentitäten ist ihre Bedeutung möglicherweise eher in der Suche nach prognostisch relevanten Untergruppen zu finden. Wie bereits erwähnt besteht die Hoffnung insbesondere bei Patienten, bei denen die aktuell angewandte Standardtherapie, wie z.B. einer kombinierten Radio-Chemotherapie, unerklärlicherweise frustriert verläuft, einen möglichen Erklärungsansatz in den Histonmodifikationen des Tumors zu finden. Das ist die Aufgabe zukünftiger Untersuchungen. Überdies muss man sich der Schwächen in der Methodik bewusst sein und gegebenenfalls auch Lösungsansätze hierfür bieten. Die beispielsweise in dieser Arbeit zur Anwendung gekommene immunhistochemische ABC-Färbung benötigt zur Auswertung erfahrene Pathologen, um reproduzierbare und somit verwertbare Ergebnisse zu erhalten, da die Bewertung Störfaktoren ausgesetzt und schlussendlich subjektiv ist. Beispielsweise kann eine unerwünschte zytoplasmatische Färbung zusätzlich zur erwarteten Kernfärbung oder eine unterschiedliche Morphologie der Zellkerne aufgrund ihres Chromatinstatus Einfluss auf den Färbereindruck nehmen. Trotz der letztendlich validen Ergebnisse ist eine objektivere Messmethode wünschenswert.

Literaturverzeichnis

1. Marshall JB, Bodnarchuk G: **Carcinoid tumors of the gut. Our experience over three decades and review of the literature.** *Journal of clinical gastroenterology* 1993, **16**(2):123-129.
2. Newton JN, Swerdlow AJ, dos Santos Silva IM, Vessey MP, Grahame-Smith DG, Primatesta P, Reynolds DJ: **The epidemiology of carcinoid tumours in England and Scotland.** *Br J Cancer* 1994, **70**(5):939-942.
3. Modlin IM, Lye KD, Kidd M: **A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors.** *Cancer* 2003, **97**(4):934-959.
4. Fidler IJ: **Critical determinants of metastasis.** *Seminars in cancer biology* 2002, **12**(2):89-96.
5. Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF: **Met, metastasis, motility and more.** *Nature reviews* 2003, **4**(12):915-925.
6. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
7. Bale AE, Norton JA, Wong EL, Fryburg JS, Maton PN, Oldfield EH, Streeten E, Aurbach GD, Brandi ML, Friedman E *et al*: **Allelic loss on chromosome 11 in hereditary and sporadic tumors related to familial multiple endocrine neoplasia type 1.** *Cancer research* 1991, **51**(4):1154-1157.
8. Klöppel G: **Neuroendokrinen Tumore des Gastrointestinaltraktes.** *Pathologe* 2003, **24**:287-296.
9. Thorson A, Biorck G, Bjorkman G, Waldenstrom J: **Malignant carcinoid of the small intestine with metastases to the liver, valvular disease of the right side of the heart (pulmonary stenosis and tricuspid regurgitation without septal defects), peripheral vasomotor symptoms, bronchoconstriction, and an unusual type of cyanosis; a clinical and pathologic syndrome.** *American heart journal* 1954, **47**(5):795-817.
10. Oberndorfer S: **Karzinoid Tumoren des Dünndarms.** *Frankf Z Pathol* 1907, **1**:426-432.
11. Shan L, Nakamura Y, Nakamura M, Yokoi T, Tsujimoto M, Arima R, Kameya T, Kakudo K: **Somatic mutations of multiple endocrine neoplasia type 1 gene in the sporadic endocrine tumors.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1998, **78**(4):471-475.
12. Shepherd JJ: **The natural history of multiple endocrine neoplasia type 1. Highly uncommon or highly unrecognized?** *Arch Surg* 1991, **126**(8):935-952.
13. Langerhans P: **Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse.** *Bechdruckerei van Gustav Lange Berlin* 1869:27.
14. Nicholls A: **Simple adenoma of the pancreatic arising from an island of Langerhans.** *J Med Res* 1902, **8**:385-395.
15. Chung DC, Smith AP, Louis DN, Graeme-Cook F, Warshaw AL, Arnold A: **A novel pancreatic endocrine tumor suppressor gene locus on chromosome 3p with clinical prognostic implications.** *The Journal of clinical investigation* 1997, **100**(2):404-410.

B

16. Beghelli S, Pelosi G, Zamboni G, Falconi M, Iacono C, Bordi C, Scarpa A: **Pancreatic endocrine tumours: evidence for a tumour suppressor pathogenesis and for a tumour suppressor gene on chromosome 17p.** *The Journal of pathology* 1998, **186**(1):41-50.
17. Moertel CG: **Karnofsky memorial lecture. An odyssey in the land of small tumors.** *J Clin Oncol* 1987, **5**(10):1502-1522.
18. Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, Ranzani GN: **K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions.** *Cancer research* 1994, **54**(6):1556-1560.
19. Klöppel G, Willemer S, Stamm B, Hacki WH, Heitz PU: **Pancreatic lesions and hormonal profile of pancreatic tumors in multiple endocrine neoplasia type I. An immunocytochemical study of nine patients.** *Cancer* 1986, **57**(9):1824-1832.
20. Pipeleers-Marichal M, Somers G, Willems G, Foulis A, Imrie C, Bishop AE, Polak JM, Hacki WH, Stamm B, Heitz PU *et al*: **Gastrinomas in the duodenum of patients with multiple endocrine neoplasia type 1 and the Zollinger-Ellison syndrome.** *The New England journal of medicine* 1990, **322**(11):723-727.
21. Proye C, Boissel P: **Preoperative imaging versus intraoperative localization of tumors in adult surgical patients with hyperinsulinemia: a multicenter study of 338 patients.** *World journal of surgery* 1988, **12**(5):685-690.
22. Lembeck F: **[Detection of 5-hydroxytryptamine in carcinoid metastases.]**. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 1954, **221**(1):50-66.
23. Williams ED, Sandler M: **The classification of carcinoid tumours.** *Lancet* 1963, **1**(7275):238-239.
24. Capella C, Heitz PU, Hofler H, Solcia E, Kloppel G: **Revised classification of neuroendocrine tumours of the lung, pancreas and gut.** *Virchows Arch* 1995, **425**(6):547-560.
25. Solcia E, Klöppel G, Sobin LH: **Histological typing of endocrine tumours.** In: *WHO International Histological Classification of Tumours*. 2nd Edn. edn. Berlin, Germany: Springer; 2000.
26. Heitz PU, Komminoth P, Perren A, Klimstra DS, Dayal Y, Bordi C, LeChago J, Centeno BA, Klöppel G: **Pancreatic endocrine tumours: introduction.** In: *Pathology and Genetics: Tumours of Endocrine Organs WHO Classification of Tumours*. Lyon: IARC Press; 2004: 177-182.
27. Anlauf M, Sipos B, Klöppel G: **Tumoren des endokrinen Pankreas.** *Pathologe* 2005, **26**:46-51.
28. Rindi G, Kloppel G, Alhman H, Caplin M, Couvelard A, de Herder WW, Eriksson B, Falchetti A, Falconi M, Komminoth P *et al*: **TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system.** *Virchows Arch* 2006, **449**(4):395-401.
29. Rindi G, Kloppel G, Couvelard A, Komminoth P, Korner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A *et al*: **TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system.** *Virchows Arch* 2007, **451**(4):757-762.

30. Whipple AO, Frantz VK: **Adenoma of Islet Cells with Hyperinsulinism: a Review.** *Annals of surgery* 1935, **101**(6):1299-1335.
31. Wilder R: **Carcinoma of the islands of the pancreas. Hyperinsulinism and hypoglycemia.** *J Am Med Assoc* 1927, **89**:348-355.
32. Chirurgische Arbeitsgemeinschaft Endokrinologie (CAEK) dDGfC: **Leitlinien zur Chirurgischen Therapie von Neuroendokrinen Tumoren des Gastro-Entero-Pankreatischen Systems. Beilage zu den Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie.** In.; Heft 3/2002.
33. Kuzin NM, Egorov AV, Kondrashin SA, Lotov AN, Kuznetsov NS, Majorova JB: **Preoperative and intraoperative topographic diagnosis of insulinomas.** *World journal of surgery* 1998, **22**(6):593-597; discussion 597-598.
34. Böttger T, Junginger T, Beyer J, Düber C: **Ist eine präoperative Lokalisationsdiagnostik beim organischen Hyperinsulinismus aus der Sicht des Chirurgen noch notwendig?** *Chirurg* 1999, **67**:268.
35. Kaczirek K, Ba-Ssalamah A, Schima W, Niederle B: **The importance of preoperative localisation procedures in organic hyperinsulinism--experience in 67 patients.** *Wiener klinische Wochenschrift* 2004, **116**(11-12):373-378.
36. Moertel CG, Lefkopoulo M, Lipsitz S, Hahn RG, Klaassen D: **Streptozocin-doxorubicin, streptozocin-fluorouracil or chlorozotocin in the treatment of advanced islet-cell carcinoma.** *The New England journal of medicine* 1992, **326**(8):519-523.
37. Krenning EP, Kwekkeboom DJ, Bakker WH, Breeman WA, Kooij PP, Oei HY, van Hagen M, Postema PT, de Jong M, Reubi JC *et al*: **Somatostatin receptor scintigraphy with [111In-DTPA-D-Phe1]- and [123I-Tyr3]-octreotide: the Rotterdam experience with more than 1000 patients.** *Eur J Nucl Med* 1993, **20**(8):716-731.
38. Jaffe R, Hashida Y, Yunis EJ: **Pancreatic pathology in hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1980, **42**(3):356-365.
39. Rivera E, Ajani JA: **Doxorubicin, streptozocin, and 5-fluorouracil chemotherapy for patients with metastatic islet-cell carcinoma.** *American journal of clinical oncology* 1998, **21**(1):36-38.
40. Wiedenmann B, Pavel M, Kos-Kudla B: **From targets to treatments: a review of molecular targets in pancreatic neuroendocrine tumors.** *Neuroendocrinology* 2011, **94**(3):177-190.
41. Goossens A, Gepts W, Saudubray JM, Bonnefont JP, Nihoul F, Heitz PU, Kloppel G: **Diffuse and focal nesidioblastosis. A clinicopathological study of 24 patients with persistent neonatal hyperinsulinemic hypoglycemia.** *The American journal of surgical pathology* 1989, **13**(9):766-775.
42. Reinecke-Luthge A, Koschoreck F, Kloppel G: **The molecular basis of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and its pathologic substrates.** *Virchows Arch* 2000, **436**(1):1-5.
43. Sempoux C, Guiot Y, Lefevre A, Nihoul-Fekete C, Jaubert F, Saudubray JM, Rahier J: **Neonatal hyperinsulinemic hypoglycemia: heterogeneity of the syndrome and keys for differential diagnosis.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 1998, **83**(5):1455-1461.

D

44. Thomas PM, Cote GJ, Wohllk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, Aguilar-Bryan L, Gagel RF, Bryan J: **Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy.** *Science (New York, NY)* 1995, **268**(5209):426-429.
45. de Lonlay-Debeney P, Poggi-Travert F, Fournet JC, Sempoux C, Vici CD, Brunelle F, Touati G, Rahier J, Junien C, Nihoul-Fekete C *et al*: **Clinical features of 52 neonates with hyperinsulinism.** *The New England journal of medicine* 1999, **340**(15):1169-1175.
46. Glaser B: **Hyperinsulinism of the newborn.** *Seminars in perinatology* 2000, **24**(2):150-163.
47. Glaser B, Kesavan P, Heyman M, Davis E, Cuesta A, Buchs A, Stanley CA, Thornton PS, Permutt MA, Matschinsky FM *et al*: **Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation.** *The New England journal of medicine* 1998, **338**(4):226-230.
48. Laidlaw GF: **Nesidioblastoma, the islet tumor of the pancreas.** *Am J Pathol* 1938, **14**:125-134.
49. Proye C, Pattou F, Carnaille B, Lefebvre J, Decoulx M, d'Herbomez M: **Intraoperative insulin measurement during surgical management of insulinomas.** *World journal of surgery* 1998, **22**(12):1218-1224.
50. Stanley CA, Lieu YK, Hsu BY, Burlina AB, Greenberg CR, Hopwood NJ, Perlman K, Rich BH, Zammarchi E, Poncz M: **Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene.** *The New England journal of medicine* 1998, **338**(19):1352-1357.
51. Calender A, Morrison CD, Komminoth P, Scoazec JY, Sweet KM: **Multiple endocrine neoplasia type 1.** In: *Pathology and genetics: tumors of endocrine organs WHO classification of tumors.* Edited by DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU: Lyon: IARC Press; 2004: 218-227.
52. Pelosi G, Bresaola E, Bogina G, Pasini F, Rodella S, Castelli P, Iacono C, Serio G, Zamboni G: **Endocrine tumors of the pancreas: Ki-67 immunoreactivity on paraffin sections is an independent predictor for malignancy: a comparative study with proliferating-cell nuclear antigen and progesterone receptor protein immunostaining, mitotic index, and other clinicopathologic variables.** *Human pathology* 1996, **27**(11):1124-1134.
53. Thompson NW, Lloyd RV, Nishiyama RH, Vinik AI, Strodel WE, Allo MD, Eckhauser FE, Talpos G, Mervak T: **MEN I pancreas: a histological and immunohistochemical study.** *World journal of surgery* 1984, **8**(4):561-574.
54. Anlauf M, Schlenger R, Perren A, Bauersfeld J, Koch CA, Dralle H, Raffel A, Knoefel WT, Weihe E, Ruzniewski P *et al*: **Microadenomatosis of the endocrine pancreas in patients with and without the multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome.** *The American journal of surgical pathology* 2006, **30**(5):560-574.
55. Le Bodic MF, Heymann MF, Lecomte M, Berger N, Berger F, Louvel A, De Micco C, Patey M, De Mascarel A, Burtin F *et al*: **Immunohistochemical study of 100 pancreatic tumors in 28 patients with multiple endocrine neoplasia, type I.** *The American journal of surgical pathology* 1996, **20**(11):1378-1384.
56. Vortmeyer AO, Huang S, Lubensky I, Zhuang Z: **Non-islet origin of pancreatic islet cell tumors.** *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2004, **89**(4):1934-1938.
57. Anlauf M, Bauersfeld J, Raffel A, Koch CA, Henopp T, Alkatout I, Schmitt A, Weber A, Kruse ML, Braunstein S *et al*: **Insulinomatosis: a multicentric insulinoma disease that**

- frequently causes early recurrent hyperinsulinemic hypoglycemia.** *The American journal of surgical pathology* 2009, **33**(3):339-346.
58. Ohike N, Morohoshi T: **Pathological assessment of pancreatic endocrine tumors for metastatic potential and clinical prognosis.** *Endocrine pathology* 2005, **16**(1):33-40.
 59. Zimmermann ME, Bosman FT: **Proliferative activity of well differentiated neuroendocrine tumours of the gut.** *Histology and histopathology* 2003, **18**(2):353-358.
 60. Clarke MR, Baker EE, Weyant RJ, Hill L, Carty SE: **Proliferative Activity in Pancreatic Endocrine Tumors: Association with Function, Metastases, and Survival.** *Endocrine pathology* 1997, **8**(3):181-187.
 61. Sansal I, Sellers WR: **The biology and clinical relevance of the PTEN tumor suppressor pathway.** *J Clin Oncol* 2004, **22**(14):2954-2963.
 62. Gentil Perret A, Mosnier JF, Buono JP, Berthelot P, Chipponi J, Balique JG, Cuilleret J, Dechelotte P, Boucheron S: **The relationship between MIB-1 proliferation index and outcome in pancreatic neuroendocrine tumors.** *American journal of clinical pathology* 1998, **109**(3):286-293.
 63. Imam H, Eriksson B, Oberg K: **Expression of CD44 variant isoforms and association to the benign form of endocrine pancreatic tumours.** *Ann Oncol* 2000, **11**(3):295-300.
 64. Li CC, Hirowaka M, Qian ZR, Xu B, Sano T: **Expression of E-cadherin, b-catenin, and Ki-67 in goblet cell carcinoids of the appendix: an immunohistochemical study with clinical correlation.** *Endocrine pathology* 2002, **13**(1):47-58.
 65. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ: **Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution.** *Nature* 1997, **389**(6648):251-260.
 66. de la Cruz X, Lois S, Sanchez-Molina S, Martinez-Balbas MA: **Do protein motifs read the histone code?** *Bioessays* 2005, **27**(2):164-175.
 67. Paulsen M, Ferguson-Smith AC: **DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease.** *The Journal of pathology* 2001, **195**(1):97-110.
 68. Jones PA: **Overview of cancer epigenetics.** *Seminars in hematology* 2005, **42**(3 Suppl 2):S3-8.
 69. Kamakaka RT, Biggins S: **Histone variants: deviants?** *Genes & development* 2005, **19**(3):295-310.
 70. Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, D'Esposito M: **DNA methylation 40 years later: Its role in human health and disease.** *Journal of cellular physiology* 2005, **204**(1):21-35.
 71. Santos-Rosa H, Caldas C: **Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer.** *Eur J Cancer* 2005, **41**(16):2381-2402.
 72. Flaus A, Owen-Hughes T: **Mechanisms for ATP-dependent chromatin remodelling: farewell to the tuna-can octamer?** *Current opinion in genetics & development* 2004, **14**(2):165-173.
 73. Li E: **Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development.** *Nat Rev Genet* 2002, **3**(9):662-673.

74. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y: **Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1.** *Cell* 2004, **119**(7):941-953.
75. Grewal SI, Rice JC: **Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs.** *Current opinion in cell biology* 2004, **16**(3):230-238.
76. Ng HH, Robert F, Young RA, Struhl K: **Targeted recruitment of Set1 histone methylase by elongating Pol II provides a localized mark and memory of recent transcriptional activity.** *Molecular cell* 2003, **11**(3):709-719.
77. Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T: **Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3.** *Nature* 2002, **419**(6905):407-411.
78. Gill G: **SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms?** *Genes & development* 2004, **18**(17):2046-2059.
79. Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, Kurdistani SK: **Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence.** *Nature* 2005, **435**(7046):1262-1266.
80. Mutskov V, Felsenfeld G: **Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9.** *The EMBO journal* 2004, **23**(1):138-149.
81. Sims RJ, 3rd, Nishioka K, Reinberg D: **Histone lysine methylation: a signature for chromatin function.** *Trends Genet* 2003, **19**(11):629-639.
82. Gould VE, Lee I, Wiedenmann B, Moll R, Chejfec G, Franke WW: **Synaptophysin: a novel marker for neurons, certain neuroendocrine cells, and their neoplasms.** *Human pathology* 1986, **17**(10):979-983.
83. Mosashvilli D, Kahl P, Mertens C, Holzapfel S, Rogenhofer S, Hauser S, Buttner R, Von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J: **Global histone acetylation levels: prognostic relevance in patients with renal cell carcinoma.** *Cancer Sci* 2010, **101**(12):2664-2669.
84. Rindi G, Arnold A, Bosman FT, Capella C, Klimstra DS, Klöppel G, Komminoth P, Solcia E: **Nomenclature and classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system.** In: *WHO Classification of Tumours of the Digestive System.* Lyon: IARC Press; 2010: 13-14.
85. Seligson DB, Horvath S, McBrien MA, Mah V, Yu H, Tze S, Wang Q, Chia D, Goodglick L, Kurdistani SK: **Global levels of histone modifications predict prognosis in different cancers.** *Am J Pathol* 2009, **174**(5):1619-1628.
86. Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, Soria D, Garibaldi JM, Paish CE, Ammar AA *et al*: **Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome.** *Cancer research* 2009, **69**(9):3802-3809.
87. Liu BL, Cheng JX, Zhang X, Wang R, Zhang W, Lin H, Xiao X, Cai S, Chen XY, Cheng H: **Global histone modification patterns as prognostic markers to classify glioma patients.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010, **19**(11):2888-2896.
88. Barlesi F, Giaccone G, Gallegos-Ruiz MI, Loundou A, Span SW, Lefesvre P, Kruyt FA, Rodriguez JA: **Global histone modifications predict prognosis of resected non small-cell lung cancer.** *J Clin Oncol* 2007, **25**(28):4358-4364.

89. Park YS, Jin MY, Kim YJ, Yook JH, Kim BS, Jang SJ: **The global histone modification pattern correlates with cancer recurrence and overall survival in gastric adenocarcinoma.** *Ann Surg Oncol* 2008, **15**(7):1968-1976.
90. Tzao C, Tung HJ, Jin JS, Sun GH, Hsu HS, Chen BH, Yu CP, Lee SC: **Prognostic significance of global histone modifications in resected squamous cell carcinoma of the esophagus.** *Mod Pathol* 2009, **22**(2):252-260.
91. Linggi BE, Brandt SJ, Sun ZW, Hiebert SW: **Translating the histone code into leukemia.** *J Cell Biochem* 2005, **96**(5):938-950.
92. An W, Kim J, Roeder RG: **Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53.** *Cell* 2004, **117**(6):735-748.
93. Covic M, Hassa PO, Saccani S, Buerki C, Meier NI, Lombardi C, Imhof R, Bedford MT, Natoli G, Hottiger MO: **Arginine methyltransferase CARM1 is a promoter-specific regulator of NF-kappaB-dependent gene expression.** *The EMBO journal* 2005, **24**(1):85-96.
94. Gayther SA, Batley SJ, Linger L, Bannister A, Thorpe K, Chin SF, Daigo Y, Russell P, Wilson A, Soutter HM *et al*: **Mutations truncating the EP300 acetylase in human cancers.** *Nature genetics* 2000, **24**(3):300-303.
95. de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB: **Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family.** *The Biochemical journal* 2003, **370**(Pt 3):737-749.
96. Frolov MV, Dyson NJ: **Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression.** *Journal of cell science* 2004, **117**(Pt 11):2173-2181.
97. Sengupta S, Shimamoto A, Koshiji M, Pedoux R, Rusin M, Spillare EA, Shen JC, Huang LE, Lindor NM, Furuichi Y *et al*: **Tumor suppressor p53 represses transcription of RECQ4 helicase.** *Oncogene* 2005, **24**(10):1738-1748.
98. La Thangue NB: **Histone deacetylase inhibitors and cancer therapy.** *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)* 2004, **16 Suppl 4**:64-67.
99. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K *et al*: **Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer.** *Nature genetics* 2005, **37**(4):391-400.
100. Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Bumber Y, Charo C, Yamochi T, Urano T, Furukawa K, Kwabi-Addo B *et al*: **Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation.** *Nature genetics* 2008, **40**(6):741-750.
101. van Haaften G, Dalglish GL, Davies H, Chen L, Bignell G, Greenman C, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Teague J *et al*: **Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer.** *Nature genetics* 2009, **41**(5):521-523.
102. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP *et al*: **The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer.** *Nature* 2002, **419**(6907):624-629.
103. Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF *et al*: **EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic**

- transformation of breast epithelial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(20):11606-11611.
104. Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y: **Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis.** *Cell* 2004, **116**(1):51-61.
105. Li B, Howe L, Anderson S, Yates JR, 3rd, Workman JL: **The Set2 histone methyltransferase functions through the phosphorylated carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II.** *The Journal of biological chemistry* 2003, **278**(11):8897-8903.
106. van Leeuwen F, Gafken PR, Gottschling DE: **Dot1p modulates silencing in yeast by methylation of the nucleosome core.** *Cell* 2002, **109**(6):745-756.
107. Peters AH, Mermoud JE, O'Carroll D, Pagani M, Schweizer D, Brockdorff N, Jenuwein T: **Histone H3 lysine 9 methylation is an epigenetic imprint of facultative heterochromatin.** *Nature genetics* 2002, **30**(1):77-80.
108. Plath K, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, de la Cruz CC, Otte AP, Panning B, Zhang Y: **Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation.** *Science (New York, NY)* 2003, **300**(5616):131-135.
109. Rougeulle C, Chaumeil J, Sarma K, Allis CD, Reinberg D, Avner P, Heard E: **Differential histone H3 Lys-9 and Lys-27 methylation profiles on the X chromosome.** *Molecular and cellular biology* 2004, **24**(12):5475-5484.

Der Schritt zur Promotion ist kein selbstverständlicher. Umso erfreulicher finde ich, dass eine Danksagung ganz selbstverständlich zum Umfang einer Promotionsarbeit hinzugehört. Das gibt mir die Gelegenheit mich einerseits für die Hilfestellungen bis zum Beginn der Promotionsarbeit und andererseits bei den Unterstützern währenddessen zu bedanken.

Ohne den Rückhalt meiner Familie und ihre Begeisterung für meine Interessen, wäre ich nicht da, wo ich heute stehe, und wäre nicht die Person, die ich heute bin. Dafür empfinde ich sehr viel Dankbarkeit und erfreue mich jeden weiteren Schrittes, der von ihnen begleitet wird.

Für die Hilfestellungen und die Geduld möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. med. Andreas Raffel bedanken. Ich bin mir nach wie vor bewusst, wie viel Zeit die Betreuung eines Doktoranden in Anspruch nimmt und möchte mich ganz herzlich für die unkomplizierte Zusammenarbeit bedanken. Bei Prof. Dr. med. W.-T. Knoefel möchte ich mich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung verfassen zu können, bedanken. Über die gesamte Dauer der Arbeit hatte Prof. Dr. med. Nikolas Stöcklein immer ein Ohr für meine Belange und einen Rat parat. Da das keine Selbstverständlichkeit ist, möchte ich mich dafür bedanken. Während meiner Experimente standen mir verschiedene MTAs und wissenschaftliche Mitarbeiter zur Seite. Bei allen diesen Personen, insbesondere bei Imke und Dr. med. Georg Flügen aus unserem Labor, Katja aus dem Labor der Pathologie in Kiel, möchte ich mich für die Unterstützung bedanken. Eine Besonderheit dieser Promotionsarbeit war die enge Zusammenarbeit mit Kollegen der Pathologie. Hier möchte ich ganz besonders für die großzügige Unterstützung Prof. Dr. med. Martin Anlauf, Dr. med. Juliane Bauersfeld und Dr. med. Tobias Henopp danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Dr. med. Omid Nikoubashman für seine konstruktive Hilfe in entscheidenden Momenten bedanken. Allen anderen Unterstützern, die ich an dieser Stelle vergessen haben sollte, möchte ich hiermit auch danken.

Ich werde die Arbeiten im Rahmen der Dissertation vor allem als sehr lehrreiche Zeit in Erinnerung behalten.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

7. November 2014 Kourosch Roushan