

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Roden

Die Überexpression von Molekülen des Wnt-Signalwegs beim humanen
Insulinom

Dissertation

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

vorgelegt von

Alexander Pohle

2019

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Sven Schinner

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Dirk Graf

Meiner Frau Cecilie

Zusammenfassung

Der Wnt-Signalweg spielt bei der Tumorentwicklung in verschiedenen Geweben eine Rolle. Zudem werden Wnt-Signalmoleküle in der pankreatischen beta-Zelle exprimiert und die Insulinsekretion und die Proliferation von pankreatischen beta-Zellen wird *in vitro* und in Tierversuchen durch Wnt-Signale reguliert. Vor diesem Hintergrund war Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob der Wnt-Signalweg auch eine Rolle bei der Entstehung humaner Insulinome spielt. Zu diesem Zweck wurden Expressionsmuster verschiedener Wnt-Signalmoleküle bei benignen und malignen humanen Insulinomen immunhistochemisch im Vergleich zum gesunden Gewebe untersucht. Durch Färbung mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper konnte gezeigt werden, dass Wnt4, Wnt3a, Frizzled und *Transcription Factor 7-like 2* (TCF7L2) beim gesunden humanen endokrinen Pankreasgewebe exprimiert werden. Anschließend wurde gezeigt, dass Wnt3a bei humanen Insulinomen (n=61) stark überexprimiert wird verglichen mit gesundem humanen endokrinen Pankreasgewebe. Zudem konnte auch eine Überexpression des Wnt-Rezeptors Frizzled nachgewiesen werden. Das Wnt-Signalmolekül Wnt4 hingegen wurde beim humanen Insulinom im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht überexprimiert. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass eine Deregulierung des Wnt-Signalwegs bei der Entstehung von humanen Insulinomen eine Rolle spielt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde darüber hinaus gezeigt, dass Wnt3a bei den benignen Insulinomen deutlich stärker exprimiert wurde als bei den malignen Insulinomen. Frizzled war sowohl bei den benignen als auch den malignen Insulinomen ähnlich stark exprimiert.

Für das Krankheitsbild der Insulinome ist in dieser Arbeit ein großer Datensatz untersucht worden. Aus den Befunden dieser Arbeit lässt sich ableiten, dass Wnt3a und Frizzled zur Proliferation von beta-Zellen in der Entstehungssequenz zu Insulinomen beitragen können. Beide Moleküle können nicht als Marker für die Malignität humaner Insulinome herangezogen werden können.

Abstract

The Wnt signalling pathway is involved in tumour development in various tissues. Additionally, Wnt signalling molecules are expressed in the pancreatic beta cell and Wnt signalling regulates insulin secretion and the proliferation of pancreatic beta cells *in vitro* and in animal models. Given this background, it was the aim of this thesis to investigate whether the Wnt signalling pathway plays a role in the development of human insulinomas. For this purpose the expression patterns of different Wnt signalling molecules in benign and malignant insulinomas compared to healthy tissue were investigated by immunohistochemistry. By staining with the respective specific antibody it could be demonstrated that Wnt4, Wnt3a, Frizzled and transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) are expressed in the healthy human endocrine pancreatic tissue. Subsequently, it was demonstrated that Wnt3a is strongly overexpressed in the human insulinoma (n=61) compared to healthy human endocrine pancreatic tissue. Further, an overexpression of Wnt receptor frizzled could be established. The Wnt signalling molecule Wnt4, however, was not overexpressed in the human insulinoma compared to the control group. The results suggest that a dysregulation of the Wnt signalling pathway plays a role in the development of insulinomas.

Within the scope of this thesis it was further demonstrated that Wnt3a was expressed significantly stronger in the benign insulinomas than in the malignant insulinomas. Frizzled was expressed to the same extent in the benign insulinomas as well as in the malignant insulinomas.

A large data set was investigated in this thesis for the clinical picture of insulinomas. From the results of this thesis it can be assumed that Wnt3a and frizzled can contribute to the proliferation of beta cells in the development sequence to insulinomas. Both molecules cannot be used as markers for the malignancy of human insulinomas.

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-amino-9-Ethylkarbazol
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AFP	Alpha-Fetoprotein
AJCC	American Joint Committee of Cancer
APC	Adenomatous Polyposis Coli Protein
ATF	Activating Transcription Factor
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CT	Computertomographie
DAXX	Death-domain-associatet protein
DNA	Desoxyribonucleinacid
EMT	Epitheleal-Mesenchymal-Transition
ENETS	European Neuroendocrine Tumor Society
Exd4	Exedin-4
FSH	Follikelstimulierende Hormon
GH	Growth Hormone
GLP-1	Glucagon-like Peptide-1
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase 3
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
IRS	Immunreaktiver Score
INS-1	Insulinom-Rattenzelllinie
LEF	Lymphoid Enhancer Factor
LRP	Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein
LSAB	Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode
MANEC	Mixed adeno-neuroendocrine carcinoma
MEEC	Mixed exocrine-endocrine carcinoma
MEN1	Multiple endokrine Neoplasie Typ I
MiNEN	Mixed neuroendocrine-nonneuroendocrine neoplasm
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
NEC	Neuroendocrine carcinoma
NET	Neuroendocrine tumour

NETub	Neuroendocrine tumour with unkown behavior
NF	Non-Functioning
NIPH	Non-Insulinoma Pancreatogenous Hypoglycemia
PDEC	Poorly differentiated endocrine carcinoma
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PHHI	Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy
Pitx2	Paired-like homeodomain transcription factor 2
PRL	Prolactin
sFRP	Secreted Frizzled-related Protein
shRNA	Small hairpin Ribonucleinacid
SUR1	Sulfonylurea Receptor 1
TBST	Tris-buffered saline with Tween20
TCF	T cell-specific Transcription Factor
TCF7L2	Transcription Factor 7-like 2
TLL	Tumour-like lesions
TMA	Tissue-Microarray
TMN	Tumor-node-metastasis
TP53	Tumorprotein 53
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
UICC	Union for International Cancer Control
VHL	Von-Hippel-Lindau-Syndrom
VIP	Vaskoaktives intestinales Polypeptid
WDEC	Well-differentiated endocrine carcinoma
WDET	Well-differentiated endocrine tumour
WHO	World Health Organization

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Neuroendokrine Tumoren des Pankreas.....	1
1.1.1 Definition und Epidemiologie	1
1.1.2 Pathologie.....	2
1.1.3 Nomenklatur und Klassifikation.....	4
1.2 Insulinome	10
1.2.1 Allgemeines und Pathologie	10
1.2.2 Symptomatik.....	11
1.2.3 Diagnose	12
1.2.4 Therapie	17
1.3 Der Wnt-Signalweg	18
1.3.1 Der Aufbau des Wnt-Signalwegs	18
1.3.2 Die Signalkaskade des kanonischen Wnt-Signalwegs	21
1.3.3 Der kanonische Wnt-Signalweg und die pankreatische beta-Zelle.....	23
1.4 Ziel der Arbeit.....	27
2 Material und Methoden.....	28
2.1 Patienten und Tumorgewebe	28
2.2 Material.....	33
2.2.1 Antikörper und Chemikalien.....	33

2.2.2	Lösungen und Puffer	34
2.2.3	Verbrauchsmaterialien	35
2.2.4	Geräte	35
2.3	Methoden	36
2.3.1	Tissue-Microarray	36
2.3.2	Immunhistochemie	37
2.3.2.1	Allgemeines	37
2.3.2.2	Herstellung von Paraffinschnitten	38
2.3.2.3	Vorbereitung der Gewebeschnitte mittels Antigendemaskierung	38
2.3.2.4	Vorbereitung der Gewebeschnitte mittels Avidin-/ Biotin-Block	39
2.3.2.5	Vorbereitung des Gewebes durch Peroxidase- Block	39
2.3.2.6	Vorbereitung der Gewebeschnitte mittels Protein- Block	40
2.3.2.7	Primärantikörper und Negativkontrolle	40
2.3.2.8	Detektionssysteme / Sekundärantikörper	41
2.3.2.9	Färbung	41
2.3.2.10	Nachbehandlung	42
2.3.3	Auswertung	42
2.3.3.1	Immunhistochemische Auswertung	42
2.3.3.2	Statistische Auswertung	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Expression von Molekülen des Wnt-Signalwegs beim gesunden humanen Pankreasgewebe	44
3.1.1	Expression von Wnt4 beim gesunden humanen Pankreasgewebe	45
3.1.2	Expression von Wnt3a beim gesunden humanen Pankreasgewebe	45
3.1.3	Expression von Frizzled beim gesunden humanen Pankreasgewebe	46

3.1.4	Expression von TCF7L2 beim gesunden humanen Pankreasgewebe	47
3.2	Expression von Molekülen des Wnt-Signalwegs beim humanen Insulinom	48
3.2.1	Expression von Wnt4 beim humanen Insulinom	48
3.2.2	Expression von Wnt3a beim humanen Insulinom	50
3.2.3	Expression von Frizzled beim humanen Insulinom	52
3.2.4	Expression von TCF7L2 beim humanen Insulinom	54
4	Diskussion.....	55
4.1	Vergleichende Betrachtung der untersuchten Insulinome	55
4.2	Überexpression von Wnt3a beim humanen Insulinom	56
4.3	Überexpression von Frizzled beim humanen Insulinom	58
4.4	Keine Überexpression von Wnt4 beim humanen Insulinom	61
4.5	Physiologische Bedeutung von Wnt4 in Bezug auf die pankreatische beta-Zelle	63
5	Literaturverzeichnis.....	65

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Die Signalkaskade des Wnt-Signalwegs.....	22
Abb. 2: Verteilung nach Geschlecht sowie Dignität der Tumoren	28
Abb. 3: Verteilung der Patienten nach Alter	29
Abb. 4: Mittleres Lebensalter der Patienten	29
Abb. 5: Verteilung der Insulinome nach Tumorklassen	30
Abb. 6: Verteilung der Insulinome nach TNM-Stadium	31
Abb. 7: Lokalisation der Metastasen	31
Abb. 8: Lokalisation der Insulinome im Pankreas.....	32
Abb. 9: Verteilung nach TumorgroÙe in mm	33
Abb. 10: LSAB-Methode	38
Abb. 11: Expression von Wnt4 in pankreatischen Inseln	45
Abb. 12: Expression von Wnt3a in pankreatischen Inseln	46
Abb. 13: Expression von Frizzled in pankreatischen Inseln	46
Abb. 14: Expression von TCF7L2 in pankreatischen Inseln	47
Abb. 15: Auswertung der Expression von Wnt4 beim Insulinom	48
Abb. 16: Schwache Expression von Wnt4 beim malignen Insulinom	49
Abb. 17: Starke Expression Wnt4 beim gesunden Pankreasgewebe	49
Abb. 18: Auswertung der Expression von Wnt3a beim Insulinom	50
Abb. 19: Expression von Wnt3a beim benignen Insulinom	51
Abb. 20: Expression von Wnt3a beim gesunden Pankreasgewebe	51
Abb. 21: Auswertung der Expression von Frizzled beim Insulinom.....	52
Abb. 22: Überexpression von Frizzled beim benignen Insulinom.....	53
Abb. 23: Expression von Frizzled beim gesunden Pankreasgewebe	53
Abb. 24: Keine Expression von TCF7L2 beim malignen Insulinom.....	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inzidenz der neuroendokrinen Tumoren und ihre Malignität.....	2
Tabelle 2: WHO-Klassifikationen.....	9
Tabelle 3: Biochemische Muster bei Hypoglykämie	14
Tabelle 4: Verwendete Antikörper	41
Tabelle 5: Scoring-Modell für die immunhistochemische Auswertung	43
Tabelle 6: Antikörperetablierung beim gesunden Pankreasgewebe	44

1 Einleitung

1.1 Neuroendokrine Tumoren des Pankreas

1.1.1 Definition und Epidemiologie

Bei neuroendokrinen Tumoren des Pankreas handelt es sich um seltene neuroendokrine Neoplasien (Oberg 2010). Neuroendokrine Neoplasien stellen eine heterogene Tumorgruppe dar (Barakat, Meeran et al. 2004, Anlauf, Gerlach et al. 2011) und können sich im gesamten Verdauungstrakt, in der Lunge, in Mamma, Ovarien, Prostata und weiteren inneren Organen und der Haut bilden (Modlin, Lye et al. 2003, Begum, Maasberg et al. 2012). Die meisten neuroendokrinen Tumoren treten im Gastrointestinaltrakt und im Pankreas auf (Kloppel 2007).

Neuroendokrine Tumoren des Pankreas sind meistens gleichmäßig im gesamten Pankreas verteilt, hiervon ausgenommen sind Gastrinome und pankreatische Polypeptidome, die sich vor allem im Pankreaskopf befinden (Oberg 2010). Häufig produzieren sie Chromogranin, pankreatisches Polypeptid und humanes Choriongonadotropin (Nobels, Kwekkeboom et al. 1997, Eriksson, Oberg et al. 2000, Stridsberg, Eriksson et al. 2005, Oberg 2010). Auch wenn die meisten neuroendokrinen Tumoren des Pankreas multiple gastrointestinale Hormone produzieren, ist in der Regel nur ein Hormon für das klinische Symptom verantwortlich (Chiang, O'Dorisio et al. 1990, Oberg and Eriksson 2005, Kloppel 2007, Oberg 2010).

Die Inzidenz und Prävalenz neuroendokriner Tumoren des Pankreas hat in den letzten zwei Jahrzehnten stetig zugenommen, die Inzidenzrate beträgt 4-5/1.000.000 (Oberg 2010). Neuroendokrine Tumoren des Pankreas machen ca. 1-10% aller pankreatischer Neoplasien aus (Mignon 2000, Oberg and Eriksson 2005, Falconi, Plockinger et al. 2006, Yao, Eisner et al. 2007, Metz and Jensen 2008, Oberg 2010). Die Prävalenzrate funktionaler neuroendokriner Tumoren des Pankreas insgesamt beträgt ca. 10/1.000.000 (Oberg 2010). Dagegen liegt

die Prävalenz in Autopsiestudien mit 0,5%-1,5% höher (Oberg and Eriksson 2005, Metz and Jensen 2008, Oberg 2010). Das Insulinom ist der am häufigsten auftretende funktionelle Tumor mit einer Inzidenz von 1-3/1.000.000 pro Jahr, gefolgt vom Gastrinom (siehe Tabelle 1) (de Herder, Niederle et al. 2006, Metz and Jensen 2008, Kulke, Anthony et al. 2010, Oberg 2010, Vanderveen and Grant 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012).

Tabelle 1: Inzidenz der neuroendokrinen Tumoren und ihre Malignität
(Oberg 2010)

Tumor	Inzidenz (pro Million)	Malignität
Insulinom	1-3	<10%
Gastrinom	0,5-3	60-90%
Nonfunctional Tumors/PPoma	0,2-2	70%
VIP	0,05-0,2	80%
Glukagonom	0,01-0,1	80%
Somatostatinom	Selten	50%
Karzinoid	Selten	94%

Bei multipler endokriner Neoplasie Typ I (MEN1), dem von-Hippel-Lindau-Syndrom (VHL), Neurofibromatose und Tuberosklerose besteht eine erhöhte Inzidenz von neuroendokrinen Tumoren des Pankreas. Ca. 80-100% der Patienten mit MEN1 entwickeln nicht-funktionale neuroendokrine Tumoren des Pankreas, 50-60% entwickeln Gastrinome und 20% entwickeln Insulinome (Alexakis, Connor et al. 2004, Jensen, Berna et al. 2008, Metz and Jensen 2008).

1.1.2 Pathologie

In der Regel sind neuroendokrine Tumoren des Pankreas solitäre, gut abgegrenzte und hochdifferenzierte Neoplasien (Oberg 2010, Kloppel 2011). Ihre Größe beträgt zwischen 0,5 und 5,0 cm (Oberg 2010) bzw. 1,0 und 5,0 cm (Kloppel 2011). Multiple Tumoren sind selten; hier besteht stets der Verdacht auf MEN1 oder ein VHL-Syndrom (Rindi and Bordi 2005, Oberg 2010, Kloppel 2011).

Prognose und metastatisches Potenzial werden durch Größe, Infiltration, Metastasen, Angioinvasion und Proliferationsaktivität bestimmt (Kloppel 2011).

Ursprünglich wurde angenommen, dass neuroendokrine Tumoren des Pankreas ihren Ursprung in Zellen haben, die Teil des diffusen neuroendokrinen Zellsystems sind. Diese Zellen teilen bestimmte biochemische Eigenschaften, nämlich *Amine Precursor Uptake* und Decarboxylierung, und entsprechend wurden die Tumoren als APUDome bezeichnet. Weiter wurde angenommen, dass neuroendokrine Tumoren des Pankreas von den Langerhans-Inselzellen stammen. Entsprechend werden neuroendokrine Pankreastumoren oft Inselzelltumoren genannt. Allerdings legen neuere Studien nahe, dass diese Tumoren von pluripotenten Stammzellen im duktalem Epithel ausgehen (Vortmeyer, Huang et al. 2004, Oberg and Eriksson 2005, Kloppel 2007, Kloppel, Anlauf et al. 2007, Oberg 2010). Häufig haben diese Tumoren duktales Strukturen. Sie produzieren teilweise Hormone, die normalerweise nicht im erwachsenen Pankreas vorhanden sind, und häufig dominiert ein Hormon das klinische Syndrom, obwohl die Tumoren multiple Hormone produzieren (Chiang, O'Dorisio et al. 1990, Oberg and Eriksson 2005, Kloppel 2007, Oberg 2010).

Auch wenn neuroendokrine Tumoren des Pankreas meist sporadisch auftreten, sind sie in seltenen Fällen aber auch Teil eines vererbten Syndroms wie beispielsweise MEN1, VHL oder Tuberosklerose (de Herder 2004, Rindi and Bordi 2005, Oberg 2010, Kloppel 2011). Bei einem MEN1-Syndrom liegt eine Keimbahnmutation des Meningens, eines Tumorsuppressors, vor. Studien haben gezeigt, dass mutierte Gene, die vererbte Syndrome verursachen, auch in einigen Fällen sporadischer neuroendokriner Tumoren des Pankreas wichtig sind (Zhuang, Vortmeyer et al. 1997, Wang, Ebrahimi et al. 1998, Gortz, Roth et al. 1999, Rindi, Villanacci et al. 2001, Metz and Jensen 2008). Obwohl neuroendokrine Tumoren des Pankreas in den meisten Fällen nicht Teil eines MEN1-Syndroms sind, wurden in Mutationsanalysen bei 44% der neuroendokrinen Tumoren des Pankreas somatische Mutationen des Meningens festgestellt (Jiao, Shi et al. 2011), was die Bedeutung von Menin für

die Tumorgenese neuroendokriner Tumoren des Pankreas unterstreicht. Darüber hinaus wurde in 25% der neuroendokrinen Tumoren des Pankreas eine Mutation des Gens festgestellt, das *DAXX (death-domain-associated protein)* kodiert (Jiao, Shi et al. 2011). Bei hochdifferenzierten neuroendokrinen Tumoren des Pankreas fehlen hingegen häufig Veränderungen der sonst häufigen Onkogene (z.B. KRAS) oder Tumorsuppressorgene (z.B. TP53), was wiederum bei schlecht differenzierten neuroendokrinen Karzinomen des Pankreas anders ist. Letztere zeigen häufig Veränderungen von TP53 und, wenn auch weniger häufig, Veränderungen von KRAS (Yachida, Vakiani et al. 2012).

1.1.3 Nomenklatur und Klassifikation

Eine Einteilung der neuroendokrinen Tumoren des Pankreas erfolgt in Abhängigkeit von ihrer Hormonproduktion in funktionelle und nicht-funktionelle Tumoren. Neuroendokrine Tumoren des Pankreas werden als funktionell klassifiziert, wenn Sie mit einem hormonellen klinischen Syndrom verbunden sind, welches durch eine Hormonausschüttung durch den Tumor verursacht wird. Sie werden üblicherweise nach dem Hormon/den Hormonen benannt, welche/s vorherrschend ausgeschüttet wird/werden, wie Insulinome, Gastrinome, Glucagonome, VIP (vasoaktives intestinales Polypeptid)-ome und Somatostatiome (Kloppel 2007). Als nicht-funktionell werden Tumoren klassifiziert, wenn sie klinisch nicht mit einem hormonellen Syndrom assoziiert sind (Metz and Jensen 2008, Oberg 2010). Die Angaben zum Anteil von nicht-funktionellen neuroendokrinen Tumoren an der Gesamtheit der neuroendokrinen Tumoren des Pankreas variieren zwischen 60-90% (Bilimoria, Tomlinson et al. 2007, Halfdanarson, Rabe et al. 2008, Franko, Feng et al. 2010, Zhang, Francois et al. 2013, Falconi, Eriksson et al. 2016). Sie haben statistisch eine signifikant schlechtere Prognose als funktionelle neuroendokrine Tumoren des Pankreas (Halfdanarson, Rabe et al. 2008).

Die Nomenklatur und Klassifikation neuroendokriner Neoplasien ist auch heute noch uneinheitlich, was die Gefahr von Missverständnissen mit sich bringt.

Studien in Bezug auf neuroendokrine Neoplasien haben sich in der Regel auf Tumoren eines speziellen Organs, zum Beispiel der Lunge oder des Pankreas konzentriert, was dazu geführt hat, dass viele Vorschläge zur Nomenklatur und Klassifikation neuroendokriner Neoplasien erschienen sind, die sich in Bezug auf die Terminologie und der Kriterien des *Grading* und der Stadieneinteilung unterscheiden (Arnold 2005, Klimstra, Modlin et al. 2010).

Im Jahre 1907 wurde von Oberndorfer der Begriff „Karzinoid“ für solche Tumoren des Dünndarms verwendet, die eine relativ monotone Struktur haben und in ihrem Verhalten weniger aggressiv als Karzinome sind (Oberndorfer 1907). Erst später hat man herausgefunden, dass auch diese Tumoren potenziell maligne sind (Perren, Schmitt et al. 2009).

William und Sandler klassifizierten im Jahre 1963 gastroenteropankreatische neuroendokrine Neoplasien nach ihrem embryologischen Ursprung aus dem Vorderdarm (Magen, Duodenum, oberes Jejunum und Pankreas), Mitteldarm (unteres Jejunum, Ileum, Appendix und Zökum) und Hinterdarm (Kolon und Rektum) als „*foregut*“, „*midgut*“ und „*hindgut*“ (Williams and Sandler 1963). Diese Einteilung hat sich jedoch mit der Zeit als nicht mehr praktikabel erwiesen, da man inzwischen weiß, dass es eine Vielzahl unterschiedlicher gastroenteropankreatischer neuroendokriner Neoplasien, insbesondere bei den Vorderdarmtumoren, gibt (Kloppel 2011) und die Einteilung zur Unterscheidung dieser verschiedenen Neoplasieentitäten zu unpräzise war (Kloppel, Perren et al. 2004).

Das erste Klassifikationssystem der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für neuroendokrine Tumoren wurde 1980 veröffentlicht. Dieses verwendete den Begriff „Karzinoid“ für den Großteil der neuroendokrinen Tumoren, eine Differenzierung erfolgte nur für die endokrinen Tumoren des Pankreas und der Schilddrüse, für Paragangliome, kleinzellige Lungenkarzinome und Merkel-Zell-Tumoren der Haut. Bei Anwendung dieser WHO-Klassifikation kam es jedoch aufgrund unterschiedlicher Verständnisse des Begriffes „Karzinoid“ durch Pathologen und Kliniker zu Missverständnissen. Darüber hinaus erwies sich die

Klassifizierung als „Karzinoid“ aufgrund der Heterogenität dieser Tumoren als unzureichend (Kloppel, Perren et al. 2004).

Im Jahre 2000 (Solcia, Kloppel et al. 2000) bzw. 2004 (Heitz, Komminoth et al. 2004) wurden neue WHO-Klassifikationssysteme für den Gastrointestinaltrakt bzw. für den Pankreas veröffentlicht. In diesen wurden, vor dem Hintergrund der vorstehend geschilderten Schwierigkeiten bei der Anwendung des WHO-Klassifikationssystems von 1980, die neutraleren und präziseren Begriffe „endokrine Tumoren“ und „endokrine Karzinome“ verwendet. In einem ersten Schritt wurde zwischen rein endokrinen Tumoren und gemischt endokrinen/exokrinen Tumoren unterschieden. Eine Einteilung der rein endokrinen Neoplasien erfolgte in einem weiteren Schritt in drei Hauptgruppen: (1) hochdifferenzierter endokriner Tumor mit benignem Verhalten oder unbekanntem Verhalten, (2) hochdifferenziertes endokrines Karzinom mit niedriggradiger Malignität und (3) gering differenziertes endokrines Karzinom mit hochgradiger Malignität (Solcia, Kloppel et al. 2000 , Heitz, Komminoth et al. 2004, Kloppel, Perren et al. 2004, Perren, Schmitt et al. 2009, Oberg 2010, Kloppel 2011). Der Begriff „Karzinoid“ wurde im Wesentlichen, wenn auch noch nicht vollständig aufgegeben. So wurde der Begriff beispielsweise bei gastroenterologischen endokrinen Tumoren als Synonym zu dem Begriff „hochdifferenzierter endokriner Tumor“ verwendet (Solcia, Kloppel et al. 2000 , Heitz, Komminoth et al. 2004, Kloppel, Perren et al. 2004). Darüber hinaus erfolgte in einem dritten Schritt eine Einteilung der Tumoren aufgrund des Ursprungsorgans und der endokrinen Funktion (Solcia, Kloppel et al. 2000 , Heitz, Komminoth et al. 2004, Kloppel, Perren et al. 2004, Perren, Schmitt et al. 2009). Dabei wurden die folgenden morphologischen/biologischen Kriterien angewandt: Tumorgröße, Ausmaß der Invasion, proliferative Aktivität, der Nachweis von Gefäßeinbrüchen und das Vorhandensein von Metastasen (Solcia, Kloppel et al. 2000 , Heitz, Komminoth et al. 2004, Kloppel, Perren et al. 2004, Perren, Schmitt et al. 2009).

Zusätzlich zu der WHO-Klassifikation hat die *European Neuroendocrine Tumor Society* (ENETS) 2006 (Rindi, Kloppel et al. 2006) und 2007 (Rindi, Kloppel et al. 2007) eine „*tumor-node-metastasis*“ (TNM)-Stadieneinteilung sowie ein

proliferationsbasiertes *Grading* vorgeschlagen. Für das proliferationsbasierte *Grading* werden folgende drei Gruppen unterschieden: G1 \leq 2%, G2 3-20% und G3 $>$ 20%. Die Bestimmung der proliferativen Aktivität erfolgt durch die Bestimmung des Ki-67/MIB-1-Index im Schnittpräparat oder durch Mitosezählung (Rindi, Kloppel et al. 2006, Rindi, Kloppel et al. 2007, Oberg 2010, Anlauf 2011). Durch die TNM-Klassifikation wird eine standardisierte onkologische Stratifizierung und eine detaillierte Prognoseeinschätzung ermöglicht (Anlauf, Gerlach et al. 2011). Sowohl die TNM-Stadieneinteilung als auch das *Grading* wurden durch verschiedene Studien für neuroendokrine Neoplasien des Vorderdarms und insbesondere des Pankreas validiert (Ekeblad, Skogseid et al. 2008, Fischer, Kleeff et al. 2008, Pape, Jann et al. 2008, La Rosa, Klersy et al. 2009, Scarpa, Mantovani et al. 2010).

Im Jahre 2009 erschien die siebte Auflage des *American Joint Committee on Cancer (AJCC) / der Union for International Cancer Control (UICC)*, die eine TNM-Klassifikation für die gastrointestinalen und pankreatischen neuroendokrinen Neoplasien beinhaltet (Sobin, Gospodarowicz et al. 2009). Diese Klassifikation entsprach in großen Teilen dem ENETS-Klassifikationssystem, wich jedoch in einigen wichtigen Punkten davon ab, insbesondere bei den TNM-Klassifikationen der neuroendokrinen Neoplasien des Appendix und des Pankreas (Kloppel, Rindi et al. 2010, Oberg 2010, Anlauf 2011, Anlauf, Gerlach et al. 2011, Kloppel 2011). Das System fand zudem keine Anwendung auf hochgradige (groß- und kleinzellige) neuroendokrine Karzinome. Im Ergebnis existierten damit zwei parallele Klassifikationssysteme, die dieselbe Terminologie verwendeten, sich aber auf verschiedene Krankheitstypen oder -ausmaße bestimmter gastroenteropankreatischer neuroendokriner Neoplasien bezogen (Kloppel, Rindi et al. 2010, Oberg 2010, Kloppel 2011). Die AJCC/UICC-TNM-Klassifikation wurde 2016 aktualisiert (Brierley, Gospodarowicz et al. 2016) und korrespondiert nunmehr auch hinsichtlich der neuroendokrinen Tumoren des Pankreas mit der ENETS-Klassifikation (Chen, Zhou et al. 2017).

Im Jahre 2010 erschien ein neues Klassifikationssystem der WHO (Rindi, Arnold et al. 2010). Anders als bei der vorherigen WHO-Klassifikation liegt

dieser die Annahme zugrunde, dass alle neuroendokrinen Neoplasien potenziell maligne sein können, dass sie aber mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit Metastasen bilden. Eine Einteilung erfolgt nur noch auf Grundlage der (beibehaltenen) Kriterien der Differenzierung und der Proliferation, während die weiteren Kriterien wie Tumorgöße, Tumorausbreitung und Gefäßinvasion in die TNM-Stadieneinteilung verlagert wurden (Rindi, Arnold et al. 2010, Anlauf 2011, Anlauf, Gerlach et al. 2011) (siehe Tabelle 2). Weiter wurde die Bezeichnung „neuroendokrin“ offiziell aufgenommen. Hierdurch soll verdeutlicht werden, dass neoplastische Zellen neuronale Marker wie Synaptophysin exprimieren (Kloppel 2011). Der Begriff „neuroendokrine Neoplasie“ wird als Oberbegriff sowohl für die hoch als auch für die schlecht differenzierten neuroendokrinen Tumoren verwendet. Die rein neuroendokrinen Neoplasien des Gastrointestinaltrakts und des Pankreas werden nunmehr nur noch in zwei Gruppen unterteilt, nämlich (1) die hochdifferenzierten neuroendokrinen Tumoren und (2) die schlecht differenzierten neuroendokrinen Karzinome. Es wird nicht mehr differenziert zwischen einem hochdifferenzierten Tumor und einem hochdifferenzierten neuroendokrinen Karzinom, diese werden in der ersten Gruppe zusammengefasst und dann nach ihrer proliferativen Aktivität entweder als G1 (wird dem Karzinoid gleichgesetzt) oder G2 klassifiziert. Der Begriff „neuroendokrines Karzinom“ umfasst dagegen alle schlecht differenzierten neuroendokrinen Neoplasien. Diese werden als G3 klassifiziert und dann weiter unterteilt in klein- und großzellige Neoplasien (Rindi, Arnold et al. 2010, Anlauf 2011, Anlauf, Gerlach et al. 2011, Kloppel 2011).

Das WHO-Klassifikationssystem der neuroendokrinen Tumoren wurde im Jahr 2017 überarbeitet (Lloyd, Osamura et al. 2017). Insbesondere werden die nach der WHO-Klassifikation von 2010 als G3 klassifizierten neuroendokrinen Karzinome nunmehr weiter unterteilt in hochdifferenzierte neuroendokrine Tumoren G3 (NET G3) und schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome (NEC G3) (Kim, Hong et al. 2017, Lloyd, Osamura et al. 2017).

Tabelle 2: WHO-Klassifikationen

WHO-Klassifikationen der neuroendokrinen Neoplasien im Zeitablauf (abgewandelt nach Anlauf, Gerlach et al. 2011 und unter Berücksichtigung der WHO-Klassifikation von 2017)

WHO 1980	WHO 2000/2004	WHO 2010	WHO 2017
Karzinoid	Hochdifferenzierter neuroendokriner Tumor (WDET)	Hochdifferenzierter neuroendokriner Tumor (NET) G1 (Karzinoid) G2	Hochdifferenzierter neuroendokriner Tumor (NET) G1 G2 G3
	Hochdifferenziertes neuroendokrines Karzinom (WDEC)		
	Gering differenziertes (kleinzelliges) neuroendokrines Karzinom (PDEC)	Gering differenziertes (klein- oder großzelliges) neuroendokrines Karzinom (NEC) G3	Gering differenziertes (klein- oder großzelliges) neuroendokrines Karzinom (NEC) G3
Mukokarzinoid geschichtetes Karzinoid/ Adenokarzinom	Gemischtes endokrines/exokrines Karzinom (MEEC)	Gemischtes Adeno-/ neuroendokrines Karzinom (MANEC)	Gemischtes neuroendokrines- nichtneuroendokrine Neoplasie (MiNEN)
Pseudotumoröse Läsion	Tumorähnliche Läsion (TLL)	Hyperplastische und präneoplastische Läsion	

Im Jahre 2012 veröffentlichte die ENETS neue Richtlinien für die Behandlung von Patienten mit neuroendokrinen Neoplasien (Falconi, Bartsch et al. 2012, Jensen, Cadiot et al. 2012). Eine Anpassung des TNM-Klassifikationssystem und des *Grading* ist dabei nicht erfolgt. In diesen ENETS-Richtlinien wurde die von der WHO in 2010 festgelegte Nomenklatur übernommen. Dies bedeutet, dass der Begriff „neuroendokrin“ verwendet wird, der Begriff „Neoplasie“ als Oberbegriff definiert wird, der die niedrig-, mittel- und hochgradigen Tumoren umfasst, der Begriff „Tumor“ für die niedrig- und mittelgradigen Neoplasien und der Begriff Karzinom nur für die hochgradigen Neoplasien verwendet wird (Falconi, Bartsch et al. 2012, Jensen, Cadiot et al. 2012, Salazar, Wiedenmann et al. 2012). Auch die Aktualisierung der ENETS-Richtlinien von 2016 hat keine

Anpassung des TNM-Klassifikationssystems oder des *Grading* mit sich gebracht (Falconi, Eriksson et al. 2016).

In der medizinischen Literatur ist die Terminologie nicht einheitlich. Auch wenn der Terminus „Neoplasie“ im Vergleich zum Terminus „Tumor“ der akkuratere und der von der WHO als Oberbegriff verwendete ist, ist der Begriff „neuroendokriner Tumor“ weit verbreitet akzeptiert, so dass dieser im Folgenden verwendet wird.

1.2 Insulinome

1.2.1 Allgemeines und Pathologie

Insulinome sind Tumoren der insulinproduzierenden beta-Zellen des Pankreas und, wie bereits dargestellt, die häufigsten auftretenden funktionellen neuroendokrinen Pankreastumoren. Im Gegensatz zu unauffälligen beta-Zellen scheiden Insulinome auch bei niedrigem Blutzuckerspiegel weiterhin Insulin und Proinsulin aus (Guettier and Gorden 2010). Insulinome sind ganz überwiegend benigne, nur weniger als 10% sind maligne (Service, McMahon et al. 1991, Grant 2005, Oberg 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012). 5% zeigen Metastasen, diese befinden sich üblicherweise in der Leber oder in den regionalen Lymphknoten (Metz and Jensen 2008, Oberg 2010). Es gibt eine altersspezifische Inzidenzspitze in der fünften Lebensdekade und die Inzidenz ist bei Frauen leicht höher als bei Männern (Service, McMahon et al. 1991, Oberg 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012).

Insulinome befinden sich fast immer im Pankreas und sind dort zu je 1/3 im Pankreaskopf, -körper und -schwanz verteilt (Oberg and Eriksson 2005, Oberg 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012). In sehr seltenen Fällen sind sie ektop, lokalisiert im Duodenum, Meckeldivertikel, Gallengang, in den Ovarien oder im Omentum (Oberg and Eriksson 2005, Oberg 2010). Sie sind in der Regel klein, so sind 40% kleiner als 1 cm, 50% zwischen 1-5 cm groß und nur in seltenen Fällen sind sie größer als 5 cm (Oberg 2010). Sie sind meistens solitär, nur in

weniger als 10% der Fälle liegen multiple Tumoren vor (de Herder, Niederle et al. 2006, Oberg 2010). Insulinome können in seltenen Fällen Teil eines vererbten MEN1-Syndroms sein (Service, McMahon et al. 1991, de Herder, Niederle et al. 2006, Oberg 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012). So sind ca. 4-8% der Insulinome mit MEN1 assoziiert (de Herder 2004, Metz and Jensen 2008, Kloppel 2011, Jensen, Cadiot et al. 2012).

Zur Unterstützung der Diagnose und zur richtigen Klassifikation von Insulinomen ist eine detaillierte Beschreibung der makroskopischen, mikroskopischen und immunhistochemischen Befunde obligatorisch. Es muss eine histologische Untersuchung von Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Schnittpräparaten sowie eine Immunfärbung mit Chromogranin A, Synaptophysin und Insulin durchgeführt werden. Die Bestimmung des Mitoseindex und Ki67 sind obligatorisch. Die immunhistochemische Bestimmung der Insulinexpression ist nicht zwingend aussagekräftig, da manche Insulinome sich nicht positiv färben lassen, was möglicherweise durch die schnelle Freisetzung von Insulin durch die beta-Zelle verursacht werden kann (Rindi and Kloppel 2004, de Herder, Niederle et al. 2006, Jensen, Cadiot et al. 2012).

1.2.2 Symptomatik

Patienten mit Insulinomen haben Symptome einer Hypoglykämie (Stefanini, Carboni et al. 1974, de Herder, Niederle et al. 2006, Metz and Jensen 2008, Cryer, Axelrod et al. 2009, Mathur, Gorden et al. 2009, Kulke, Anthony et al. 2010, Oberg 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012). Die hypoglykämischen Symptome lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen: (1) neuroglykopenische Symptome und (2) autonome Symptome. Die neuroglykopenischen Symptome beinhalten Verwirrtheit, Sehstörung, Schwindel, Kopfschmerzen, Verhaltensänderungen und, in seltenen Fällen, neurologische Anfälle und Koma. Die meisten Patienten haben zudem autonome Symptome, insbesondere aufgrund der katecholaminergen Gegenregulation, wie Schwitzen, Tremor, Schwäche, Angstzustände, Übelkeit, Palpitationen und Reizbarkeit (Stefanini,

Carboni et al. 1974, Grant 2005, de Herder, Niederle et al. 2006, Mathur, Gorden et al. 2009, Guettier and Gorden 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012). Die Symptome treten häufig während körperlicher Aktivität, vor dem Frühstück oder nach einer verpassten Mahlzeit auf. Die Patienten versuchen häufig, die Symptome zu vermeiden, indem sie häufige Mahlzeiten zu sich nehmen, was Adipositas zur Folge haben kann (Grant 2005, Oberg 2010). Die hypoglykämischen Episoden treten sporadisch auf. Es gibt symptomfreie Intervalle von einigen Wochen oder Monaten. Viele Insulinompatienten werden vor der richtigen Diagnose wegen Fehlinterpretation der Symptome zum Psychiater überwiesen (Oberg 2010).

Zum klinischen Leitbild gehört die Whipple-Trias. Sie besteht aus (1) Symptomen der Hypoglykämie, (2) einem Blutzuckerspiegel $\leq 2,2$ mmol/l (≤ 40 mg/dl) und (3) einer prompten Besserung bei Glukosezufuhr (de Herder, Niederle et al. 2006, Cryer, Axelrod et al. 2009, Jensen, Cadiot et al. 2012).

1.2.3 Diagnose

Es gibt sechs etablierte Kriterien für die Diagnose von Insulinomen (Service, Dale et al. 1976, Service 1995, Service 1997, de Herder, Niederle et al. 2006, Vinik, Woltering et al. 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012):

- Dokumentierter Blutzuckerspiegel von $\leq 2,2$ mmol/l (≤ 40 mg/dl)
- Insulinspiegel von ≥ 6 μ U/ml (≥ 36 pmol/l, ≥ 3 μ U/ml ICMA)
- C-Peptidspiegel von ≥ 200 pmol/l
- Proinsulinspiegel von ≥ 5 pmol/l
- beta-Hydroxybutyratspiegel $\leq 2,7$ mmol/l
- Abwesenheit von Sulfonylharnstoff (Metabolit) im Plasma und/oder Urin

Nichtsdestotrotz variieren die genauen Kriterien für die Diagnose von Insulinomen in verschiedenen Konsensdokumenten und *Reviews* (Cryer, Axelrod et al. 2009, Nauck and Meier 2012, Buffet, Vezzosi et al. 2013, Cryer, Axelrod et al. 2013, Guettier, Lungu et al. 2013, Falconi, Eriksson et al. 2016).

Zum Goldstandard für die Diagnose von Insulinomen gehört nach wie vor der 72h-Hungertest (Service 1995, Kaltsas, Besser et al. 2004, de Herder, Niederle et al. 2006, Cryer, Axelrod et al. 2009, Vinik, Woltering et al. 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012), auch wenn es Studien gibt, wonach ein 48h-Hungertest ausreichen soll (Hirshberg, Livi et al. 2000, Quinkler, Strelow et al. 2007). Ein Drittel der Insulinompatienten entwickelt Symptome innerhalb von 12h, 80% nach 24h, 90% nach 48h und 100% nach 72h (Fajans and Vinik 1989, Grama, Eriksson et al. 1992, Grant 2005, Metz and Jensen 2008). Wenn der Patient Symptome entwickelt und der Blutzuckerspiegel $\leq 2,2$ mmol/l (≤ 40 mg/dl) beträgt, wird Blut abgenommen zur Bestimmung von C-Peptid, Proinsulin und Insulin. Erfolgt bei Vorliegen einer Hypoglykämie keine angemessene Insulinsuppression, bestätigt dies die Diagnose eines Insulinoms (Service, Dale et al. 1976, Service 1995, Service 1997, de Herder, Niederle et al. 2006, Metz and Jensen 2008, Mathur, Gorden et al. 2009, Guettier and Gorden 2010, Kulke, Anthony et al. 2010, Vinik, Woltering et al. 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012).

In letzter Zeit werden anstelle von Standard *Insulinradioimmunoassays*, die in vielen Fällen Kreuzreaktionen mit Proinsulin aufweisen, vermehrt insulinspezifische Assays verwendet, die keine Kreuzreaktionen mit Proinsulinen hervorrufen und die niedrigere Insulinwerte zeigen (Vezzosi, Bennet et al. 2003, Vezzosi, Bennet et al. 2007, Vinik, Woltering et al. 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012).

Eine Nüchternhypoglykämie kann auch durch verschiedene andere Umstände hervorgerufen werden, beispielsweise durch exogene Insulinzugabe oder Antikörper gegen Insulinrezeptoren oder Insulin. Zur Differentialdiagnose wird die Messung von Proinsulin, C-Peptiden und Antikörpern gegen Insulin sowie des Sulfonylharnstoffspiegels durchgeführt. C-Peptide haben eine längere Halbwertszeit als Insulin und sind hilfreich, um Patienten mit organischer Überproduktion von Insulin, wie Patienten mit Insulinom, von Patienten mit exogener Insulinzufuhr zu unterscheiden, da kommerzielle Insulinpräparate keine C-Peptide enthalten. Bei Insulinomen ist eine erhöhte oder normale

Konzentration von C-Peptiden charakteristisch, bei Patienten, die Insulin nehmen, ist der Insulinspiegel hoch und der C-Peptid-Spiegel niedrig (siehe Tabelle 3) (Oberg 2010).

Tabelle 3: Biochemische Muster bei Hypoglykämie

Biochemische Muster bei Patienten mit unterschiedlichen Gründen für Hypoglykämie (Oberg 2010)

Insulin	C-Peptid	Proinsulin	Sulfonylharnstoff	Insulinantikörper	Diagnose
↑	↓	↓	-	-	Exogenes Insulin
↑	↑	↑	-	-	Insulinom
↑	↑	↑	+	-	Sulfonylharnstoff
↑	↑	↑	-	+	Insulin autoimmun
↑	↓	↓	-	-	Insulinrezeptor autoimmun

Weitere Formen der Nüchternhypoglykämie können eine Nebennieren- oder Hypophysenvorderlappeninsuffizienz oder schwere Lebererkrankungen bei verminderter Glukoneogenese und Glukoseabgabe sein (Service 1995, Oberg and Eriksson 2005, Guettier and Gorden 2010).

Gelegentlich sind die Symptome von Insulinomen unspezifisch, so dass eine breite Differenzialdiagnose erfolgen sollte (de Herder, Niederle et al. 2006, Jensen, Cadiot et al. 2012). Unterschieden werden sollte zwischen Patienten mit Insulinomen und mit NIPH (*Non-Insulinoma Pancreatogenous Hypoglycemia*) (Service, Natt et al. 1999) und Patienten mit einer Hypoglykämie, die nach Magenbypassoperationen wegen Adipositas auftritt.

NIPH ist eine seltene Form der hyperinsulinämischen Hypoglykämie bei Erwachsenen, die unabhängig von Mutationen des Kir6.2- und des SUR1-Gens vorkommt. Es handelt sich – im Gegensatz zu einer durch Insulinome

verursachten Hypoglykämie – um eine postprandiale Hypoglykämie (Service, Natt et al. 1999, Thompson, Service et al. 2000, Anlauf, Wieben et al. 2005, Ouyang, Dhall et al. 2011). Bei diesen Patienten wurden neuroglykopenische Zeichen einer hyperinsulinämischen Hypoglykämie innerhalb von vier Stunden nach der Einnahme einer Mahlzeit sowie ein negativer 72h-Hungertest beobachtet. Bei NIPH-Patienten liegen keine Insulinome vor, sie zeigen jedoch einen positiven Kalziumstimulationstest, eine beta-Zell-Hyperplasie und eine Nesidioblastose (Service, Natt et al. 1999, Thompson, Service et al. 2000, Won, Tseng et al. 2006).

NIPH wird von PHHI (*Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy*) dadurch abgegrenzt, dass NIPH-Patienten keine Mutationen des Kir6.2- und des SUR1-Gens vorweisen (Service, Natt et al. 1999). PHHI wird klinisch charakterisiert durch hyperinsulinämische Hypoglykämie bei Kindern und Neugeborenen, es handelt sich um eine Gruppe verwandter Krankheiten (Kloppel, Reinecke-Luthge et al. 1999, Rahier, Guiot et al. 2000, Kapoor, James et al. 2009). Die Mehrheit der PHHI-Patienten weist keine Insulinome auf, hat aber fokale oder diffuse beta-Zell-Abnormalitäten, die häufig mit genetischen Mutationen verbunden sind, die die beta-Zellen beeinflussen (Kapoor, James et al. 2009).

Auch bei der Hypoglykämie nach Magenbypassoperation handelt es sich nicht um eine Nüchternhypoglykämie, sie ist vielmehr ebenfalls postprandial und in einigen Fällen verursacht durch Nesidioblastose (Patti, McMahon et al. 2005, Marsk, Jonas et al. 2010). Zwar ist Hypoglykämie nach bariatrischer Chirurgie häufig und meist verursacht durch das Dumping-Syndrom (Service, Thompson et al. 2005), bei wenigen Patienten ist sie jedoch verbunden mit einer Hyperinsulinämie (Patti, McMahon et al. 2005, Service, Thompson et al. 2005).

Auch wenn Patienten mit Insulinom typischerweise Symptome einer Nüchternhypoglykämie entwickeln, gibt es auch Patienten, die – auch ausschließlich – postprandial Symptome entwickeln (Del Sindaco, Casucci et al. 1997, Iida, Ohara et al. 2010, Toiari, Davi et al. 2013).

Im nächsten Schritt ist eine Lokalisationsdiagnostik notwendig. Da Insulinome typischerweise klein sind, können sie durch Bildgebungsverfahren teilweise schwierig nachweisbar sein. Ultraschall und CT werden üblicherweise zuerst durchgeführt, um Lebermetastasen auszuschließen. Ultraschall, CT und MRT sind in verschiedenen Studien nur in 10-40% der Fälle positiv (de Herder, Niederle et al. 2006, Rockall and Reznick 2007, Guettier and Gorden 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012). In anderen Studien wird gezeigt, dass mittels CT 70-80% und mittels MRT ca. 85% der Insulinome nachgewiesen werden können (Noone, Hosey et al. 2005). Eine Somatostatin-Rezeptor-Szintigrafie ist in nur 50% der Fälle positiv (Gibril and Jensen 2004, Virgolini, Traub-Weidinger et al. 2005, de Herder, Niederle et al. 2006, Metz and Jensen 2008, Kwekkeboom, Krenning et al. 2009, Guettier and Gorden 2010, Oberg 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012). Einige Studien kommen zu dem Ergebnis, dass bei den wenigen Patienten mit Insulinomen, bei denen die übrigen Bildgebungsverfahren negativ waren, eine ^{68}Ga -DOTA-D-Phe¹-Tyr³-octreotide-Positronen-Emissions-Tomografie (^{68}Ga -DOTATOC-PET)-CT durchgeführt werden sollte (Sundin, Garske et al. 2007, Dudczak and Traub-Weidinger 2010, Kauhanen, Seppanen et al. 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012). Weitere Studien zeigten, dass eine ^{68}Ga -DOTANOC-PET-CT nur in 25-31% der Insulinompatienten positiv ist (Sharma, Arora et al. 2015, Sharma, Arora et al. 2016).

Eine Endosonografie ist in 70-95% der Fälle positiv, wenn sie von einem erfahrenen Endoskopiker durchgeführt wird. Daher ist die Endosonografie das Bildgebungsverfahren der Wahl, wenn die anderen nicht invasiven Verfahren negativ sind (de Herder, Niederle et al. 2006, Patel and Kim 2008, Vanderveen and Grant 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012). Endosonografien können darüber hinaus bei der Feststellung helfen, ob eine Enukleation des Tumors möglich ist. Eine selektive Angiographie ist in 60% der Fälle positiv. Wenn die selektive Angiographie mit einem intraarteriellen Kalziumstimulationstest kombiniert wird, bei dem nach intraarterieller Kalziumzugabe Blut aus der *Vena hepatica* entnommen und daraus der Insulinspiegel bestimmt wird, ist sie in 88-100% der Fälle positiv (Guettier, Kam et al. 2009, Mathur, Gorden et al. 2009, Morganstein, Lewis et al. 2009, Vanderveen and Grant 2010, Jensen, Cadiot et

al. 2012). Erfolgversprechende Ergebnisse konnten auch durch Rezeptor-Szintigrafie mit GLP-1-Rezeptor-Analogen gezeigt werden, da Insulinome diesen Rezeptor häufig überexprimieren (Christ, Wild et al. 2009, Sowa-Staszczak, Pach et al. 2013, Cases, Ohtsuka et al. 2014). Mit der Kombination von nicht invasiven und ausgewählten invasiven Verfahren können die meisten Insulinome präoperativ lokalisiert werden (Kaltsas, Besser et al. 2004, Nikfarjam, Warshaw et al. 2008).

Zur operativen Lokalisierung von Insulinomen und zur Bestimmung der richtigen operativen Methode ist ein intraoperativer Ultraschall erforderlich (de Herder, Niederle et al. 2006, Jensen, Cadiot et al. 2012).

1.2.4 Therapie

Die Methode der Wahl ist eine operative Entfernung des Insulinoms. Bei sporadischen Insulinomen sollte durch Palpation und intraoperativen Ultraschall der gesamte Pankreas untersucht werden. Eine Enukleation ist die bevorzugte Methode, wenn der Tumor weiter als 2-3 mm vom pankreatischen *Ductus* lokalisiert ist; ansonsten ist eine partielle Resektion des Pankreas notwendig (Akerstrom and Hellman 2007, Jensen, Berna et al. 2008, Fendrich, Waldmann et al. 2009, Kulke, Anthony et al. 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012). Bei präoperativ lokalisierten Insulinomen können die Enukleation des Pankreaskörpers bzw. -schwanzes und die distale Pankreatektomie laparoskopisch vorgenommen werden (Fernandez-Cruz, Blanco et al. 2008, Isla, Arbuckle et al. 2009, Kulke, Anthony et al. 2010, Zhao, Zhan et al. 2011, Jensen, Cadiot et al. 2012, Su, Ke et al. 2014).

Dagegen ist eine operative Exploration bei nicht präoperativ lokalisierten sporadischen Insulinomen erforderlich (Akerstrom and Hellman 2007, Jensen, Berna et al. 2008, Fendrich, Waldmann et al. 2009, Jensen, Cadiot et al. 2012). Bei Patienten mit Verdacht auf ein malignes Insulinom oder mit Rezidiven ist eine radikale Operation notwendig (Akerstrom and Hellman 2007, Jensen, Cadiot et al. 2012). Bei Vorliegen von MEN1 ist es obligatorisch, dass zunächst

präoperativ die Insulinome lokalisiert und identifiziert werden, da hier zudem häufig andere neuroendokrine Tumoren des Pankreas vorliegen (Norton, Fang et al. 2006, Fendrich, Waldmann et al. 2009).

Zur Behandlung der Symptome der Hypoglykämie sollten längere Zeiträume ohne Glukoseeinnahme vermieden werden. In der Regel reicht es aus, dass die Patienten häufige Mahlzeiten zu sich nehmen. Bei manchen Patienten kann es notwendig sein, kontinuierlich Glukoseinfusionen zu geben (de Herder 2004, Oberg 2010).

Eine medikamentöse Behandlung erfolgt nur zur präoperativen Kontrolle des Blutzuckerspiegels, bei Patienten mit inoperablen Metastasen oder bei Patienten, bei denen eine Operation kontraindiziert ist oder die eine Operation ablehnen (de Herder, Niederle et al. 2006, Guettier and Gorden 2010, Vanderveen and Grant 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012). Durch diese medikamentöse Behandlung soll die Hypoglykämie kontrolliert werden. Das wirksamste Medikament ist Diazoxid, welches die Insulinsekretion hemmt (Goode, Farndon et al. 1986, Grant 2005, de Herder, Niederle et al. 2006, Guettier and Gorden 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012). Verapamil, Diphenylhydantoin, Glukokortikoide und Somatostatin-Analoga wie Octreotid oder Lanreotid, können auch wirksam sein (Jensen, Cadiot et al. 2012). Bei einer kleinen Anzahl von Fällen mit malignen Insulinomen konnten die Insulinausschüttung und die Hypoglykämie durch mTOR-Inhibitoren kontrolliert werden (Kulke, Bergsland et al. 2009, Kulke, Anthony et al. 2010, Ong, Henley et al. 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012).

1.3 Der Wnt-Signalweg

1.3.1 Der Aufbau des Wnt-Signalwegs

Nachdem der Wnt-Signalweg zunächst als Regulator der Embryogenese identifiziert wurde, ist inzwischen bekannt, dass er unter anderem auch eine Rolle bei der Tumorentstehung in verschiedenen Geweben spielt (Polakis 2000,

Logan and Nusse 2004). Benannt wurde der Wnt-Signalweg nach seinen Rezeptorliganden (Wnts).

Der Wnt-Signalweg besteht neben den extrazellulären Wnt-Rezeptorliganden aus sezernierten Antagonisten (wie zum Beispiel *secreted Frizzled-related Protein* (sFRP) oder das Dickkopf-Protein), Rezeptoren mit einer sieben-transmembrannösen Domäne (Frizzled) und Korezeptoren (wie zum Beispiel *Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein* (LRP) 5/6) sowie intrazellulären Signalmolekülen, von denen beta-Catenin eine Schlüsselrolle zukommt (Logan and Nusse 2004, Schinner 2009, Schinner, Willenberg et al. 2009). Üblicherweise wird zwischen dem kanonischen und dem nicht-kanonischen Wnt-Signalweg unterschieden. Bei dem kanonischen Wnt-Signalweg ist der Transkriptionskoaktivator beta-Catenin beteiligt (Schinner 2009).

Das erste Wnt-Gen wurde durch Sharma und Chopra in den 1970er-Jahren bei der Fliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Fliegen mit dieser Genmutation konnten keine Flügel und Halteren ausbilden. Daher wurde dieses Gen *wingless*-Gen (*wg*) benannt (Sharma and Chopra 1976). Anfang der 1980er-Jahre wurde bei der Maus das *Int-1*-Gen (später *Wnt-1*) entdeckt. Dieses wurde zunächst als Onkogen identifiziert, das bei Mäusen zur Bildung von Mammakarzinomen beiträgt (Nusse and Varmus 1982). Die Grundlage der Erforschung des Wnt-Signalwegs liegt in den späten 1980er- und frühen 1990er-Jahren. Zu dieser Zeit wurde herausgefunden, dass das *wingless*-Gen bei *Drosophila melanogaster* und das *Int-1*-Gen bei der Maus zu derselben großen, evolutionär erhaltenen Familie extrazellulärer Signalmoleküle gehören (Rijsewijk, Schuermann et al. 1987). Nachdem das *wingless*-Gens bei *Drosophila melanogaster* erfolgreich isoliert werden konnte, konnte gezeigt werden, dass das *wingless*-Gen und das *Int-1*-Gen homolog sind (Cabrera, Alonso et al. 1987, Rijsewijk, Schuermann et al. 1987). Aus der Verschmelzung der Namen dieser beiden ersten bekannten Vertreter dieser Genfamilie (*wingless* und *Int-1*) entstand die Bezeichnung „Wnt“ (van Amerongen and Nusse 2009, De 2011).

Der Versuch, die Wnt-Rezeptorliganden in Klassen einzuteilen, denen bestimmte Aktivitäten zugeordnet werden konnten, führte zu der Unterteilung in kanonische und nicht kanonische Wnt-Rezeptorliganden. Diese Unterteilung basierte darauf, dass nur die Vertreter der ersten Gruppe die Fähigkeit besitzen, beim Embryo des Krallenfrosches *Xenopus laevis* die Ausbildung einer zweiten Körperachse zu induzieren (McMahon and Moon 1989) und eine morphologische Transformation von C57MG-Mammazellen der Maus zu verursachen (Wong, Gavin et al. 1994), was beides mit einem Anstieg von beta-Catenin und begleitend einer beta-Catenin/*T cell-specific Transcription Factor* (TCF)-Signalübertragung einhergeht (Shimizu, Julius et al. 1997). So wurden die Wnt-Rezeptorliganden, die an Frizzled anbinden und beta-Catenin/TCF aktivieren, als kanonische Wnt-Rezeptorliganden bezeichnet. Inzwischen wurde jedoch gezeigt, dass die Wirkung eines Wnt-Gens abhängig ist vom jeweiligen Gewebe- und Rezeptorkontext. Es erscheint von diesem Hintergrund mehr passend, die Wnt-Gene trennscharf in kanonisch oder nicht-kanonisch zu unterteilen (van Amerongen and Nusse 2009).

Beim Menschen/bei Säugetieren sind inzwischen neunzehn verschiedene Wnt-Gene (Schinner 2009, van Amerongen and Nusse 2009), hierzu gehören auch die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Wnt-Gene Wnt3a und Wnt4 (van Amerongen and Nusse 2009).

Auch andere, zunächst bei *Drosophila melanogaster* identifizierte Bestandteile des Wnt-Signalwegs konnten in der Folge bei anderen Spezies gefunden werden, wie z.B. Frizzled, Dishevelled oder beta-Catenin/Armadillo und TCF/Pangolin (Peifer, Rauskolb et al. 1991, Noordermeer, Klingensmith et al. 1994, Siegfried, Wilder et al. 1994, Sussman, Klingensmith et al. 1994, Dominguez, Itoh et al. 1995, Sokol, Klingensmith et al. 1995, Brunner, Peter et al. 1997, van de Wetering, Cavallo et al. 1997) Beim Menschen sind heutzutage zehn Frizzled-Rezeptoren bekannt (van Amerongen and Nusse 2009). Bekannte Korezeptoren sind die LRP-Korezeptoren 5 und 6 (Tamai, Semenov et al. 2000).

1.3.2 Die Signalkaskade des kanonischen Wnt-Signalwegs

Beta-Catenin spielt die Schlüsselrolle in der Signalkaskade des kanonischen Wnt-Signalwegs. In Abwesenheit von Wnt-Rezeptorliganden wird beta-Catenin durch die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3) konstant phosphoryliert und dadurch inaktiviert. GSK3 ist dabei Bestandteil eines Multiproteinkomplexes, der neben GSK3 unter anderem Axin und das *Adenomatous Polyposis Coli Protein* (APC) beinhaltet (sog. *beta-catenin destruction complex*). Hierdurch kommt es zu einem konstanten Ubiquitin-vermittelten Abbau von beta-Catenin im Zytoplasma, so dass die beta-Catenin-Konzentration im Zytoplasma niedrig bleibt (Logan and Nusse 2004, Gordon and Nusse 2006, Jin 2008, Schinner 2009).

Wenn Wnt-Rezeptorliganden jedoch an der Zelloberfläche an den Rezeptor Frizzled und an einen der Korezeptoren (LRP 5 oder LRP 6) anbinden, wird die Signalkaskade des Wnt-Signalwegs angestoßen. Durch die Bindung sowohl an Frizzled als auch an LRP 5 oder LRP 6 kommt es – über eine Signalübertragung, bei u.a. der Dishevelled und Axin involviert sein sollen – zu einer Hemmung des vorgenannten Axin-APC-GSK3-Komplexes und zu einer Inaktivierung von GSK3. GSK3 kann beta-Catenin daher nicht mehr phosphorylieren. Dies wiederum führt dazu, dass beta-Catenin stabilisiert wird und in den Nukleus translozieren kann. Anschließend koaktiviert beta-Catenin spezifische Transkriptionsfaktoren an den Wnt-Zielgenen. Bei diesen koaktivierten Transkriptionsfaktoren handelt es sich um solche der *TCF/Lymphoid Enhancer Factor* (LEF)-Familie (Logan and Nusse 2004, Gordon and Nusse 2006, Jin 2008, Schinner, Ulgen et al. 2008, Schinner 2009).

In Abwesenheit von beta-Catenin im Nukleus interagiert TCF mit den Transkriptionsrepressoren Groucho und Histon-Deacetylase, indem sie gemeinsam einen Repressionskomplex bilden und so die Transkription von Wnt-Zielgenen blockieren (Cavallo, Cox et al. 1998, Chen, Fernandez et al. 1999). Transloziert jedoch beta-Catenin in den Nukleus, verdrängt es Groucho

und wandelt den Komplex zu einem Transkriptionsaktivator, wodurch die Transkription von Wnt-Zielgenen bewirkt wird (Daniels and Weis 2005).

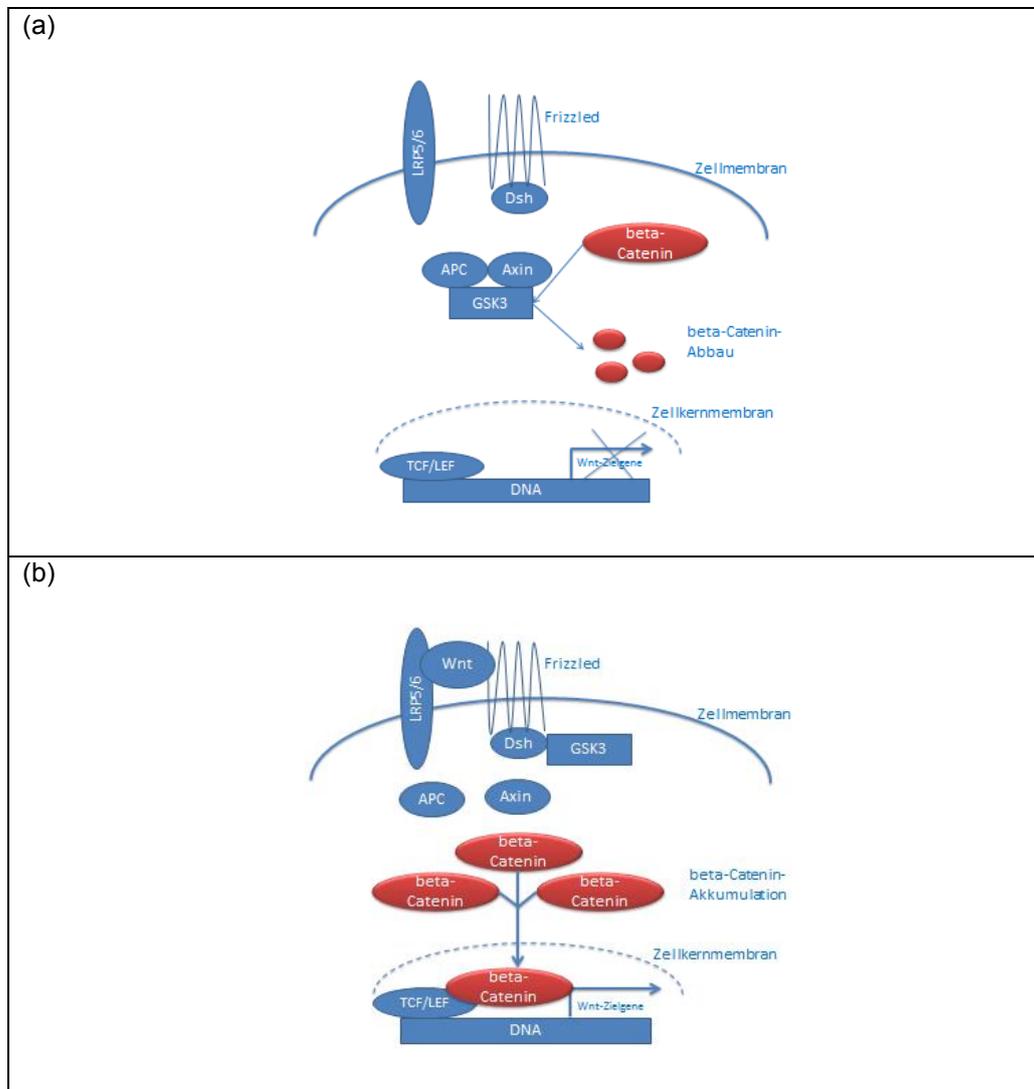


Abb. 1: Die Signalkaskade des Wnt-Signalwegs

(a) In Abwesenheit von Wnt-Rezeptorliganden wird beta-Catenin durch GSK3 phosphoryliert und dadurch seinem Abbau zugeführt.

(b) Durch Bindung von Wnt-Rezeptorliganden an Frizzled und LRP5/6 kommt es zu einer Inaktivierung von GSK3, wodurch die Phosphorylierung von beta-Catenin gehemmt wird. Daher kann beta-Catenin in den Nukleus translozieren und spezifische Transkriptionsfaktoren an den Zielgenen koaktivieren.

1.3.3 Der kanonische Wnt-Signalweg und die pankreatische beta-Zelle

Wnt-Signalmoleküle werden in der murinen sowie der humanen pankreatischen beta-Zelle exprimiert (Heller, Dichmann et al. 2002, Heller, Klein et al. 2003, Papadopoulou and Edlund 2005).

Es konnte zudem in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass der Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Insulinsekretion und der Proliferation von pankreatischen beta-Zellen spielt. Dies konnte im Rahmen von *in vitro*- und *in vivo*-Ansätzen gezeigt werden.

So zeigten Rulifson et al., dass das Protein Wnt3a die Expression von Pitx2, einem direkten Ziel des Wnt-Signalwegs, und Zyklin D2, einem wichtigen Regulator der beta-Zellzyklusprogression, unterstützt und eine Steigerung der Proliferation der beta-Zelle induziert (Rulifson, Karnik et al. 2007). Zudem war bei transgenen Mäusen die Überexpression von aktivem beta-Catenin ausreichend, um *in vivo* die Proliferationsmarker zu induzieren und zu einer Expansion der beta-Zellmasse zu führen. Umgekehrt führte die Inhibition von Wnt-Signalen durch die Überexpression von Axin zu einer Verringerung der Expression von Pitx2 und Zyklin D2 und zu einer Reduzierung der Ausdehnung der beta-Zellen *in vivo*. Hierdurch wurde gezeigt, dass der Wnt-Signalweg die Proliferation der pankreatischen beta-Zelle reguliert (Rulifson, Karnik et al. 2007).

Schinner et al. zeigten, dass Adipozyt-abgeleitete Wnt-Signalmoleküle, neben der Steigerung der Insulinsekretion, auch eine verstärkte Zyklin-D1-Transkription und eine Steigerung der Proliferation von beta-Zelllinien und primären beta-Zellen von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen induzieren (Schinner, Ulgen et al. 2008).

Darüber hinaus wurden durch Liu und Habener die Effekte des Proteins *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) und seines Agonisten Exedin-4 (Exd4) auf den Wnt-Signalweg und die Proliferation der pankreatischen beta-Zelle untersucht.

Dabei stellten sie fest, dass GLP-1 und Exd4 den kanonischen Wnt-Signalweg induzieren, und zwar sowohl bei insulinproduzierenden INS-1-Zellen als auch bei primären beta-Zellen der Maus. Übereinstimmend damit induzierte Exd4 die Aktivierung von beta-Catenin. Weiter zeigten sie, dass Exd4 die Interaktion von beta-Catenin und dem Transkriptionsfaktor TCF7L2 mit dem Zyklin-D1-Promoter erhöht. Die Hemmung von TCF7L2 durch Transfektion einer dominant-negativen Mutante hemmte die basale Proliferationsrate von INS-1-Zellen und beseitigte den stimulierenden Effekt von Exd4 auf die beta-Zellproliferation (Liu and Habener 2008).

Shu et al. zeigten, dass ein *Knockdown* von TCF7L2 in isolierten murinen und humanen Inselzellen zu einer Beeinträchtigung der beta-Zellfunktion führte. Der *Knockdown* von TCF7L2 führte zudem zu einer verminderten Proliferation und einer erhöhten Apoptose von isolierten humanen beta-Zellen. Umgekehrt beschützte die Überexpression von TCF7L2 Inselzellen vor Glukotoxizität und Zytokin-vermittelter Toxizität (Shu, Sauter et al. 2008).

Fujino et al. berichteten, dass LRP5-*Knockout*-Mäuse eine deutlich beeinträchtigte Glukosetoleranz aufwiesen. Diese Mäuse zeigten auch eine abgeschwächte Plasmainsulinkonzentration, nicht aber eine Insulinresistenz. *In vitro* zeigten isolierte Inseln von LRP5-*Knockout*-Mäusen eine verminderte glukoseinduzierte Insulinsekretion. Fujino et al. fanden heraus, dass die Behandlung mit Wnt-Rezeptorliganden die glukoseinduzierte Insulinsekretion in Wildtyp-Inseln, nicht aber in LRP5-*Knockout*-Inseln erhöhte. Dies deutet darauf hin, dass der Wnt-Signalweg zu glukoseinduzierter Insulinsekretion beiträgt und bei einem gestörten Wnt-Signalweg in Inselzellen ein gestörtes Glukose-*Sensing* vorliegt (Fujino, Asaba et al. 2003).

Hierzu passen die Ergebnisse von Schinner et. al, die zeigten, dass beta-Catenin eine Aktivierung der Glukokinase-Gentranskription in pankreatischen beta-Zellen induziert. Glukokinase ist der wesentliche Regulator des Glukose-*Sensing* in beta-Zellen (Schinner, Ulgen et al. 2008).

In Diskrepanz zu den Ergebnissen von Fujino et al. wurde jedoch durch Murtaugh et al. gezeigt, dass die Depletion von beta-Catenin im pränatalen Pankreas zwar zu Azinuszellhypoplasie führt, nicht jedoch die endokrine Zellmasse und die Entwicklung der Inselzellen signifikant stört (Murtaugh, Law et al. 2005). Die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Fujino et al. kann möglicherweise durch beta-Catenin-unabhängige Signalübertragung unterhalb von LRP5 erklärt werden. Zudem waren die von Murtaugh et al. untersuchten Mäuse 3-4 Monate alt, während die von Fujino et al. untersuchten Mäuse 6-8 Monate alt waren. Die abweichenden Ergebnisse lassen sich möglicherweise auf dieses unterschiedliche Alter der Mäuse zurückführen (Schinner, Willenberg et al. 2009).

Im Tiermodell und *in vitro* konnte darüber hinaus eine Verbindung zwischen dem Wnt-Signalweg und Menin gezeigt werden. Menin unterdrückt die Tumorgenese durch verschiedene Mechanismen: Menin reguliert die Apoptose und die DNA-Reparatur und unterdrückt die Zellproliferation durch Interaktion mit verschiedenen Signalwegen (Wu and Hua 2011).

So zeigten Cao et al., dass eine Überexpression von Menin die nukleäre Akkumulation von beta-Catenin und dessen Transkriptionsaktivität reduziert. Menin interagiert dabei direkt mit beta-Catenin und exportiert dieses aus dem Nukleus. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass Menin die Zellproliferation durch Unterdrückung der Wnt-Signale kontrolliert. Weiter implizieren die Studienergebnisse von Cao et al., dass der Wnt-Signalweg bei der beta-Zellproliferation in Verbindung mit dem Verlust von Menin aktiviert sein könnte (Cao, Liu et al. 2009).

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigten Bertolino et al., dass beim beta-Zell-spezifischen *Knockout* des MEN1-Gens bei der Maus Insulinome resultierten (Bertolino, Tong et al. 2003). Dadurch zeigten sie, dass Menin, welches durch das MEN1-Gen kodiert wird, bei der Entwicklung von Insulinomen, als Tumorsuppressor wirkt. Mutationen im MEN1-Gen sind für die Entstehung des MEN1-Syndroms verantwortlich (Chandrasekharappa, Guru et al. 1997, Lemmens, Van de Ven et al. 1997), eine Erkrankung, die mit einer

erhöhten Inzidenz von neuroendokrinen Tumoren des Pankreas und unter anderem von Insulinomen verbunden ist (Metz and Jensen 2008). Auch wenn die Mehrheit der Insulinome nicht Teil eines MEN1-Syndroms ist, zeigten Mutationsanalysen somatische Mutationen des MEN1-Gens bei 44% der pankreatischen neuroendokrinen Tumoren (Jiao, Shi et al. 2011).

Weiter zeigten Bertolino et al. in immunhistochemische Untersuchungen, dass es bei den beta-Zell-spezifischen MEN1-*Knockout*-Mäusen bei fortgeschrittenen Insulinomen zu einer Reduzierung von beta-Catenin in der Zytoplasmenmembran und zu einer Akkumulation von beta-Catenin im Zytoplasma kommt. Bertolino et al. zeigten darüber hinaus immunhistochemisch, dass bei den beta-Zell-spezifischen MEN1-*Knockout*-Mäusen das membran E-Cadherin bei fortgeschrittenen Insulinomen reduziert ist, obwohl dieses bei Insulinomen im Frühstadium das gleiche Niveau hatte wie bei normalen Inselzellen (Bertolino, Tong et al. 2003). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Veränderung der Expression von beta-Catenin und E-Cadherin ein wichtiger Punkt bei der Progression von Insulinomen ist (Bertolino, Tong et al. 2003) und dass bei beta-Zellen, bei denen Menin inaktiviert ist, der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert sein könnte (Cao, Liu et al. 2009).

Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen wurde jedoch von Chen et al. berichtet, dass Menin die Aktivität des Wnt-Signalwegs in endokrinen Pankreaszellen fördert und die Zellproliferation teilweise durch Aktivierung des Wnt-Signalweges unterdrückt (Chen, A et al. 2008).

Eine weitere Verbindung zwischen neuroendokrinen Pankreastumoren und dem Wnt-Signalweg ist das DAXX-Gen. So zeigen 25% der neuroendokrinen Pankreastumoren Mutationen des Gens, das DAXX kodiert (Jiao, Shi et al. 2011). DAXX interagiert mit Axin, einem Signalprotein des Wnt-Signalwegs, um TP53 zu aktivieren (Li, Wang et al. 2007).

Obwohl es zahlreiche Studien zum Wnt-Signalweg in der pankreatischen beta-Zelle gibt, wurde die Rolle von Wnt-Signalmolekülen bei der Entwicklung humaner Insulinome noch nicht untersucht.

1.4 Ziel der Arbeit

Wie oben dargestellt, spielt der Wnt-Signalweg bei der Tumorentwicklung in verschiedenen Geweben eine Rolle. Wie ebenfalls beschrieben, konnte herausgefunden werden, dass Wnt-Signalmoleküle in der pankreatischen beta-Zelle exprimiert werden und die Insulinausscheidung und die Proliferation von pankreatischen beta-Zellen *in vitro* und in Tierversuchen durch Wnt-Signale reguliert werden. Es ist jedoch nicht klar, ob Wnt-Signalmoleküle auch eine Bedeutung für die Entstehung humaner Insulinome haben. Vor dem Hintergrund der Bedeutung des Wnt-Signalwegs für die Tumorentstehung im Allgemeinen und für die pankreatische beta-Zelle im Besonderen ist Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob der Wnt-Signalweg auch eine Rolle bei der Entstehung humaner Insulinome spielt. Zu diesem Zweck wurden Expressionsmuster verschiedener Wnt-Signalmoleküle bei benignen und malignen humanen Insulinomen sowie bei Kontrollen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten und Tumorgewebe

In der vorliegenden Arbeit wurden 61 Patienten berücksichtigt, die an einem Insulinom erkrankt waren und die im Zeitraum von 1984 bis 2009 in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf operiert wurden. Die Patienten haben der Aufnahme in die Studie im Vorfeld schriftlich zugestimmt. Darüber hinaus wurde die Studie durch die Ethikkommission an der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf genehmigt (Aktenzeichen 3.909) und stimmt mit den Prinzipien der Deklaration von Helsinki überein. Für die Kontrollgruppe wurde gesundes humanes Pankreasgewebe vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt.

Von den 61 Patienten waren 41 Patienten Frauen (67,21%) und 20 Patienten Männer (32,79%) (siehe Abb. 2).

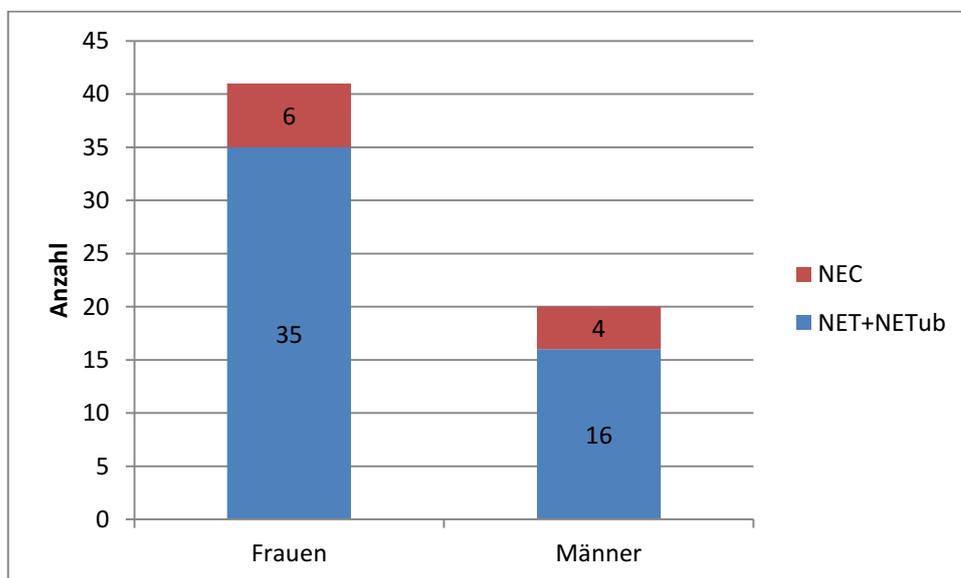


Abb. 2: Verteilung nach Geschlecht sowie Dignität der Tumoren

Die Patienten waren zwischen 16 und 82 Jahre alt, die Verteilung der Patienten nach Alter ist in Abb. 3 dargestellt. Dabei betrug das mittlere Lebensalter des gesamten Patientenkollektivs 49,59 Jahre. Die Frauen hatten ein mittleres

Lebensalter von 51,00 Jahren, die Männer von 46,70 Jahren (siehe Abb. 4). Der Altersmedian betrug 50 Jahre.

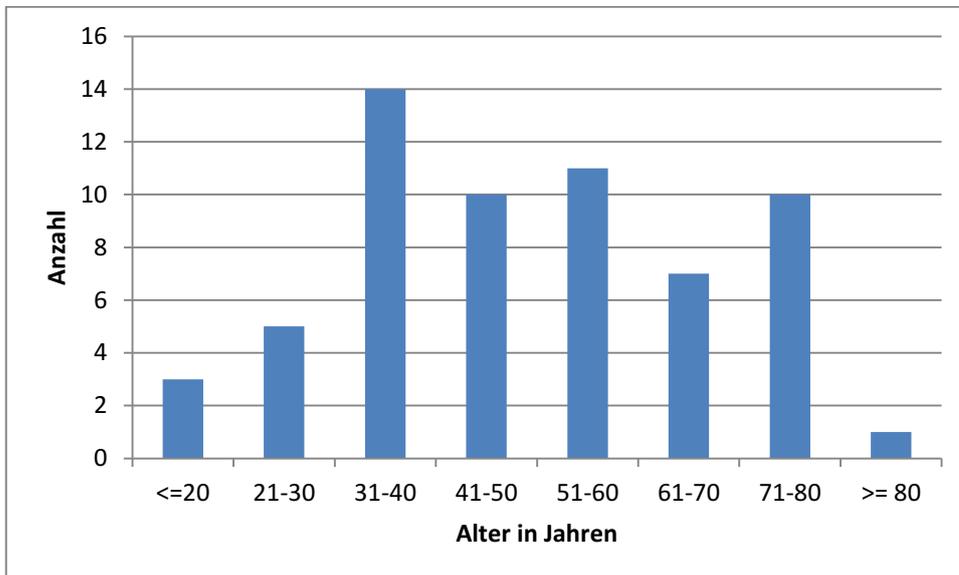


Abb. 3: Verteilung der Patienten nach Alter

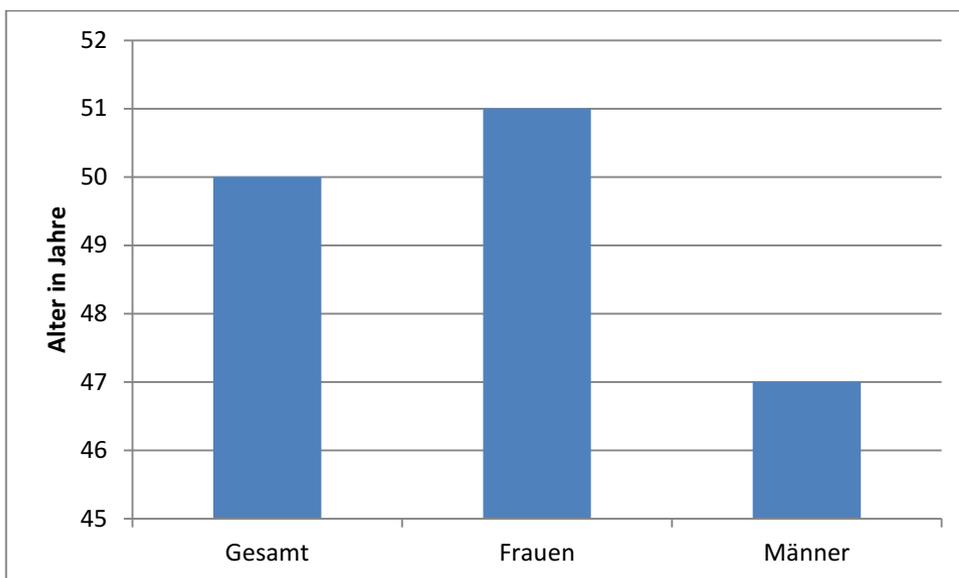


Abb. 4: Mittleres Lebensalter der Patienten

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Gewebe wurde von dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die untersuchten 61 Insulinome wurden – aufgrund des Operationszeitraums bis 2009 – nach der WHO-Klassifikation von 2004 eingeteilt. Dabei wurden 51

Insulinome als benigne klassifiziert. Von diesen 51 benignen Insulinomen waren 40 als hochdifferenzierte endokrine Tumoren mit benignem Verhalten (NET) (WHO 1A) und elf als hochdifferenzierte endokrine Tumoren mit unbekannter Dignität („*unknown behaviour*“, NETub) (WHO 1B) klassifiziert. Zehn Insulinome wurden als maligne klassifiziert. Die WHO-Klassifikation von 2004 sieht eine Unterteilung der malignen Tumoren in hochdifferenzierte endokrine Karzinome mit niedriggradiger Malignität auf der einen Seite (WHO 2) und gering differenzierte Karzinome mit hochgradiger Malignität auf der anderen Seite (WHO 3) vor. Die malignen Insulinome wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch unabhängig von ihrer Differenzierung und dem Grad der Malignität in einer Gruppe zusammengefasst (NEC). Die Einteilung der in dieser Arbeit berücksichtigten Insulinome nach Tumorklassen ist in Abb. 5 dargestellt.

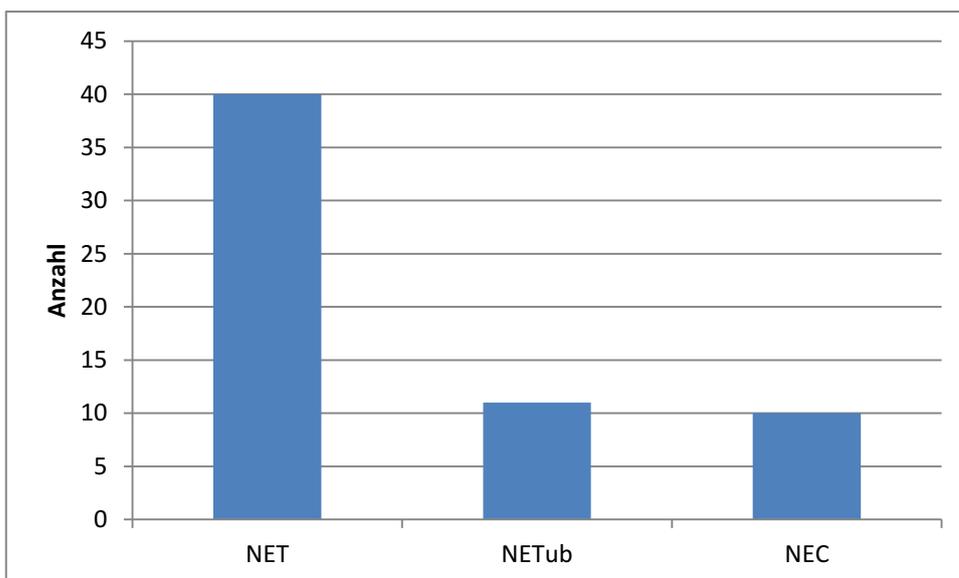


Abb. 5: Verteilung der Insulinome nach Tumorklassen

Bezogen auf das Geschlecht der Patienten ist die Verteilung der Dignität der Tumoren wie folgt: 35 Frauen hatten ein benignes Insulinom (NET und NETub), sechs Frauen hatten ein malignes Insulinom. Bei den Männern waren es 16 benigne Insulinome (NET und NETub) und vier maligne (siehe Abb. 2).

Nach der TNM-Stadieneinteilung war von den 61 Insulinomen der Großteil (38) als Tumor des Stadiums I klassifiziert (siehe Abb. 6).

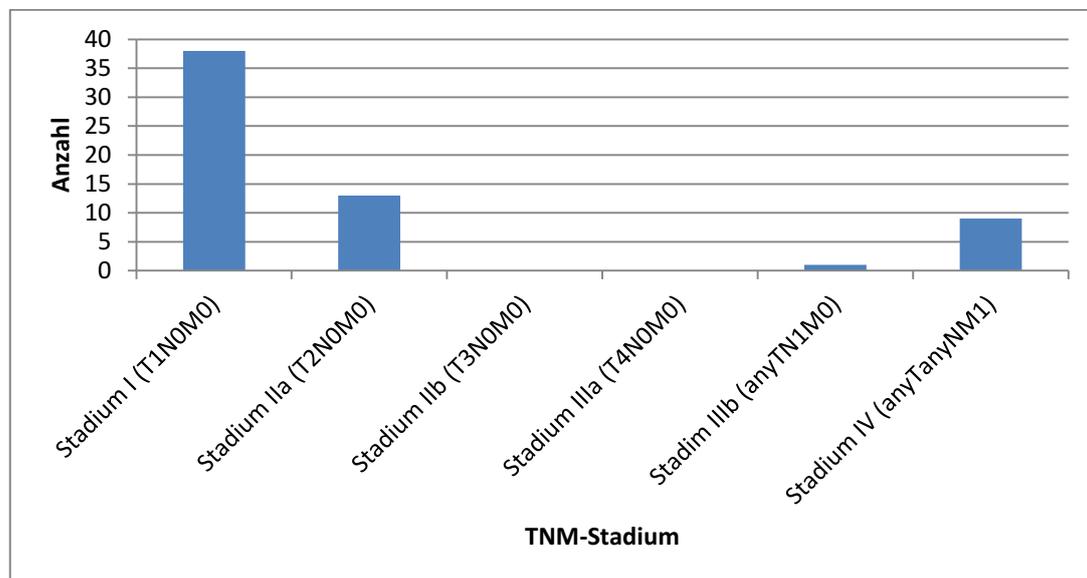


Abb. 6: Verteilung der Insulinome nach TNM-Stadium

Sämtliche Patienten mit malignem Insulinom wiesen Metastasen auf, die sich in den Lymphknoten, in der Leber, in Lymphknoten und Leber oder in Lymphknoten, Leber und Haut befanden (siehe Abb. 7).

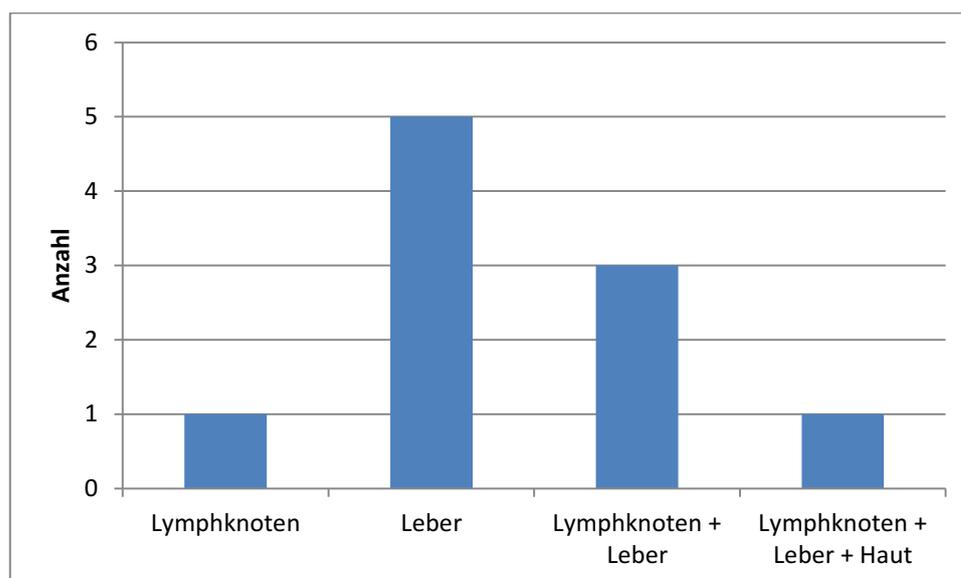


Abb. 7: Lokalisation der Metastasen

Die Insulinome waren wie folgt im Pankreas lokalisiert: 27 Insulinome (44,26%) befanden sich im Pankreasschwanz. 17 Insulinome (27,87%) waren im Pankreaskörper lokalisiert und 15 Insulinome (24,59%) befanden sich im Pankreaskopf. Zwei Fälle (3,28%) lagen diffus vor (siehe Abb. 8).

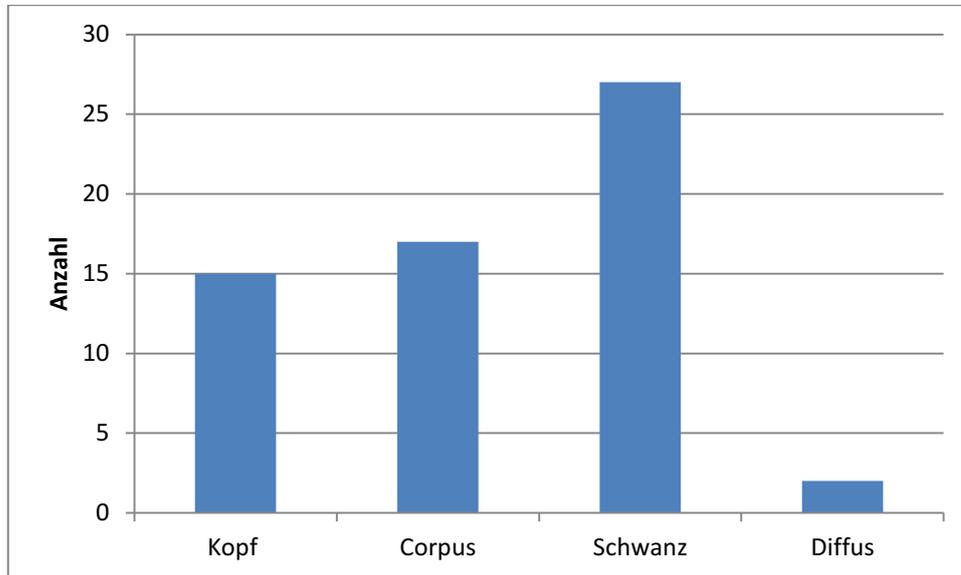


Abb. 8: Lokalisation der Insulinome im Pankreas

Die untersuchten Insulinome hatte eine Größe von 7 mm bis 80 mm. Die höchste Anzahl der Insulinome (31) war zwischen 11 mm und 20 mm groß, hiervon waren 29 benigne (NET und NETub) und zwei maligne. 18 Insulinome hatten eine Größe von bis zu 10 mm, hiervon waren 14 Insulinome benigne (NET und NETub) und vier maligne. Zwischen 21 mm und 30 mm groß waren acht Insulinome, sieben hiervon waren benigne (NETub) und eins maligne. Ein benignes Insulinom (NETub) hatte eine Größe von 35 mm, ein malignes Insulinom hatte eine Größe von 45 mm und zwei weitere maligne Insulinome waren 80 mm groß. Die durchschnittliche Tumorgöße lag bei 19,6 mm. Die Verteilung nach Tumorgöße ist in Abb. 9 dargestellt.

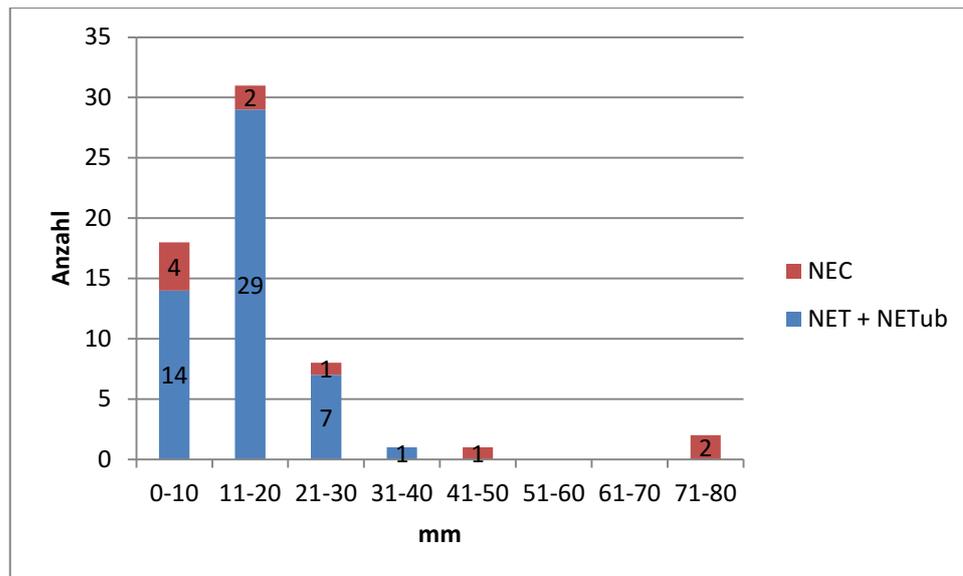


Abb. 9: Verteilung nach Tumorgröße in mm

2.2 Material

2.2.1 Antikörper und Chemikalien

Substanz	Hersteller
ABC Elite	Vektor Laboratories
AEC-High Sensitivity	Dako (Hamburg)
Substrate Chromogen	
Antibody Diluent	Dako (Hamburg)
<i>Antikörper:</i>	
• WNT4 polyclonal antibody	Abnova (Taipei, Taiwan)
• Anti-Wnt3a antibody ab28472	Abcam (Cambridge, UK)
• Frizzled (H-300): sc-9169	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, Texas, USA)
• Anti-TCF7L2 antibody ab76151	Abcam (Cambridge, UK)
Aqua destillata	Otto Fischar GmbH & Co. KG (Saarbrücken-Scheidt)
Biotin Blocking System	Dako (Hamburg)
Biotinylated Link Universal	Dako (Hamburg)

Dual Endogenous Enzym Block	Dako (Hamburg)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Faramount Aqueous	Dako (Hamburg)
Mounting Medium	
Hämatoxylin Lösung (Gill II)	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Streptavidin-HRP	Dako (Hamburg)
Swineserum	Dako (Hamburg)
LSAB+System-HRP	
Target Retrieval Solution	Dako (Hamburg)
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Xylol	Merck (Darmstadt)

2.2.2 Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
TBST-Puffer (pH 7,6; 10-fach; 0,5 l)	30,284 g Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan 43,83 g Natriumchlorid 0,5 ml Tween® 20 Aqua dest.
Ethanol-Lösung	In der gewünschten Konzentration im destillierten Wasser
Schweineserum-Lösung	Schweineserum 5%ig in TBST-Puffer

2.2.3 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser	Engelbrecht (Edermünde)
Objektträger (24x50 mm, 24x32 mm, 18x18 mm)	Marienfeld Laboratory Glassware
Pap Pen	Dako (Hamburg)
<i>Pipettenspitzen:</i>	
– ohne Filter:	
• Natural Graduated Pipette Tips (101-1000 µl)	Starlab (Ahrensburg)
• Natural Bevelled Filter Tips (1-200 µl)	Starlab (Ahrensburg)
• Extended Length, Natural Tips (0,1-10 µl)	Starlab (Ahrensburg)
Polystyrol-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (1,6 ml, steril)	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
Stripetten (5, 10, 25 ml)	Corning Incorporated Costar (Corning, New York, USA)
UVetten®	Eppendorf (Hamburg)

2.2.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage	Mettler AE
Backofen	Memmert
Bildbearbeitungsprogramm	AxioVision 4.72
Lichtmikroskop: Axioskop / AxioCAM	Zeiss (Jena)
MRC	
Mikrotome Blades	Feather (Japan)

PH-Meter	WTW (Weilheim)
Pipetten 1-10 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten 10-100 µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten 100-1000 µl	Eppendorf (Hamburg)
Schlittenmikrotom	Microm
Stoppuhr	Oregon scientific
Vortex Mixer	Janke & Kunkel IKA Labortechnik
Wasserbad	SAKURA
<i>Zentrifugen:</i>	
• Biofuge pico	Heraeus (Hanau)
• Centrifuge 5810 R	Eppendorf (Hamburg)
• Zentrifuge universal 30RF	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)

2.3 Methoden

2.3.1 Tissue-Microarray

Sowohl das gesunde humane Pankreasgewebe als auch die Insulinome liegen in Gewebelöcken vor, wobei die Insulinome in sogenannten *Tissue-Microarrays* (TMA) vorliegen. Diese Untersuchungsmethode ist 1998 von Kononen, Bubendorf et al. entwickelt worden. Sie dient dazu, eine große Anzahl an Gewebe unter standardisierten Bedingungen immunhistochemisch zu untersuchen (Kononen, Bubendorf et al. 1998).

Das untersuchte Tumorgewebe wurde in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Dann wurde dieses Gewebe mit Hämatoxylin/Eosin und Synaptophysin (AB SY38; *antihuman synaptophysine, mouse-ab, clone SY38, no. M0776*, Verdünnung: 1:50, Dako) gefärbt. Alle geeigneten Fälle wurden anschließend überprüft, um den Bereich des Spenderblocks auszuwählen, aus dem das Gewebe für die TMA-Konstruktion genommen wurde. Vor der TMA-Konstruktion wurden diese Areale nochmals von einem Pathologen bewertet. Das markierte Material wurde mit einem Durchmesser von 1,5 mm ausgestanzt und mit Hilfe eines manuellen Arraying-Geräts in einen Empfängerblock

eingesetzt. Insgesamt wurden vier TMA-Blöcke bestehend aus Gewebe von 63 Patienten mit Insulinom hergestellt (Raffel, Krausch et al. 2011). Von diesen 63 Patienten wurden im Rahmen dieser Arbeit lediglich 61 Patienten berücksichtigt, da das Gewebe zweier Patienten mikroskopisch nicht auswertbar war.

2.3.2 Immunhistochemie

2.3.2.1 Allgemeines

Durch die Immunhistochemie können Gewebe- bzw. Zellstrukturen durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion am histologischen Schnitt sichtbar gemacht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die sogenannte indirekte Methode angewandt. Bei dieser wird neben dem spezifischen Primärantikörper ein weiterer Antikörper verwendet, der sich gegen den Primärantikörper richtet (Sekundärantikörper). Anders als bei der sogenannten direkten Methode wird nicht der Primärantikörper, sondern der Sekundärantikörper mit einem Enzym markiert. Zunächst wird der Primärantikörper auf das zu untersuchende Gewebe aufgetragen. Anschließend wird der enzymmarkierte Sekundärantikörper aufgetragen und die Farbreaktion mittels einer Enzym-Substrat-Reaktion ausgelöst. Die indirekte Methode ist flexibler und deutlich empfindlicher als die direkte Methode. Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufgrund ihrer hohen Sensitivität die *Labelled-Streptavidin-Biotin*-Methode (LSAB-Methode) angewandt (siehe Abb. 10). Bei dieser Methode wird die große Affinität von Streptavidin für Biotin zur Kopplung von enzymmarkiertem Avidin an biotinylierte Sekundärantikörper nutzbar gemacht.

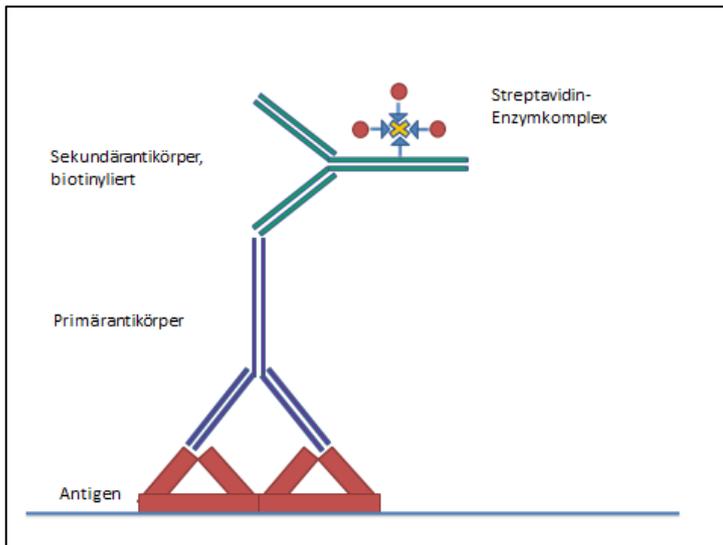


Abb. 10: LSAB-Methode

2.3.2.2 Herstellung von Paraffinschnitten

Zunächst wurden aus den TMA-Blöcken Gewebeschichten von 5-6 μm geschnitten. Die geschnittenen Gewebeschichten wurden dann auf Objektträger aufgezogen und in einem Heizofen über zwei Stunden bei 60° Celsius angebacken. Die Schnitte wurden anschließend mit Xylol zweimal fünf Minuten entparaffiniert und mit einer absteigenden Ethanol-Verdünnungsreihe (100%, 100%, 90%, 90%, 70%, 70%) für jeweils eine Minute dehydriert. Im Anschluss erfolgte eine Spülung der Schnitte für eine Minute in Aqua dest.

2.3.2.3 Vorbereitung der Gewebeschnitte mittels Antigendemaskierung

Bei formalinfixiertem Gewebe kommt es zu einer Beeinträchtigung der Immunreaktivität, da durch das Einwirken der Formalinlösung zur Fixierung des Gewebes eine Quervernetzung der Gewebeproteine entsteht (Maskierung). Es gibt verschiedene Verfahren, mit denen diese Quervernetzung zum Teil wieder rückgängig gemacht und dadurch die Immunreaktivität zum Teil wiederhergestellt werden kann (Antigendemaskierung).

Die Antigendemaskierung wurde für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen mit den Antikörpern gegen

Wnt4, Wnt3a, Frizzled, und TCF7L2 entsprechend der vom jeweiligen Antikörperhersteller empfohlenen Methode durchgeführt. So wurden zuerst die Gewebeschnitte in der *Target Retrieval Solution* bei 440 Watt in der Mikrowelle für zweimal sieben Minuten erhitzt. Im Anschluss erfolgte nach einer zwanzigminütigen Abkühlung das Waschen der Gewebeschnitte im TBST-Bad.

2.3.2.4 Vorbereitung der Gewebeschnitte mittels Avidin-/Biotin-Block

Beim Nachweis von Gewebeantigenen durch Immunohistochemie kann das Vorliegen von endogenem Biotin die Auswertung einer spezifischen Färbung behindern. Hierdurch sind falsch positive Ergebnisse oder Fehldeutungen möglich. Der Avidin-/Biotin-Block blockiert solche durch endogenes Biotin verursachten unspezifischen Färbungen.

In einem ersten Schritt erfolgte daher eine Inkubation der Gewebeschnitte für zehn Minuten mit unkonjugiertem Avidin. Hierdurch wurde das endogene Biotin blockiert. In einem zweiten Schritt wurden die Gewebeschnitte mit unkonjugiertem Biotin für zehn Minuten inkubiert. Hierdurch wurde die Biotinbindungsrestaktivität des Avidinmoleküls blockiert. Im Anschluss erfolgte die Waschung der Gewebeschnitte im TBST-Bad für dreimal fünf Minuten.

2.3.2.5 Vorbereitung des Gewebes durch Peroxidase-Block

Da die Möglichkeit besteht, dass auf den Gewebeschnitten endogene Peroxidasen existieren, kann es unter der Verwendung der LSAB-Methode ebenfalls zu unspezifischen Färbungen und damit zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der immunhistochemische Nachweis mit Hilfe von peroxidasekonjugierten Streptavidinmolekülen durchgeführt wird. Um solche falsch positiven Ergebnisse durch endogene Peroxidasen zu verhindern, wurden die Gewebeschnitte für zehn Minuten mit *Dual Endogenous Enzyme Block* von Dako inkubiert. Hierdurch konnte die endogene Peroxidaseaktivität neutralisiert

werden. Es folgte dann das erneute Waschen der Gewebeproben im TBST-Bad für dreimal fünf Minuten.

2.3.2.6 Vorbereitung der Gewebeschnitte mittels Protein-Block

Zur Verhinderung falsch positiver Ergebnisse durch unspezifische Proteinbindung wurden die Gewebeschnitte für eine Stunde mit 5%igen Schweineserum, welches in TBST gemischt wurde, inkubiert.

2.3.2.7 Primärantikörper und Negativkontrolle

Das restliche Schweineserum wurde dann vom Objektträger entfernt. Im nächsten Schritt wurde das Gewebe mit dem jeweiligem Primärantikörper inkubiert. Die Primärantikörper wurden in *Antibody Diluent* verdünnt. Die Negativkontrolle erfolgte ebenfalls mit *Antibody Diluent*. Die Inkubation erfolgte über die ganze Nacht. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte im TBST-Bad für dreimal fünf Minuten gewaschen.

Die immunhistochemische Untersuchung wurde mit polyklonalen Antikörpern der Spezies Kaninchen gegen Wnt4, Wnt3a und Frizzled sowie mit monoklonalen Antikörpern der Spezies Kaninchen gegen TCF7L2 durchgeführt. Um die optimale Antikörperkonzentration herauszufinden, wurden die Antikörper zunächst an gesundem humanen Pankreasgewebe mit verschiedenen Verdünnungen gefärbt (1:10, 1:25, 1:30, 1:50, 1:100, 1:200). Daraufhin wurden die Gewebeschnitte mikroskopiert, um die Antikörperkonzentrationen im Hinblick auf Farbqualität und Farbintensität zu beurteilen. Als Ergebnis wurde die optimale Antikörperkonzentration festgelegt (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Spezifität	Klonalität	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Wnt4	polyklonal	Kaninchen	Abnova PAB 9584	1:25
Wnt3a	polyklonal	Kaninchen	Abcam ab28472	1:25
Frizzled	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz sc9169	1:25
TCF7L2	monoklonal	Kaninchen	Abcam ab76151	1:25

2.3.2.8 Detektionssysteme / Sekundärantikörper

Die mit den Primärantikörpern inkubierten Gewebeschnitte wurden dann mit einem Detektionssystem bearbeitet. Dabei wurden die Gewebeschnitte 60 Minuten mit dem *Biotinylate Link Universal* (Dako) inkubiert. Im Anschluss erfolgte das Waschen der Gewebeproben im TBST-Bad für dreimal fünf Minuten. Daraufhin wurden die Gewebeproben mit Streptavidin HRP für 60 Minuten inkubiert. Als nächstes erfolgte eine erneute Waschung im TBST-Bad für dreimal fünf Minuten.

2.3.2.9 Färbung

Im nächsten Schritt wurde auf die Gewebeschnitte zur Färbung eine Substratchromogenlösung mit 3-amino-9-Ethylkarbazol (AEC) aufgetragen. Nach acht Minuten Inkubationszeit wurde die erhoffte Farbintensität erzielt. Dabei entwickelte das Zielantigen eine rote Färbung am Bindungsort des Antikörpers. Danach wurden die Gewebeschnitte zwei Minuten mit Aqua dest. gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine einminütige Gegenfärbung im Hämatoxylin-Bad. Hierdurch wurde die Färbung abgeschlossen.

2.3.2.10 Nachbehandlung

Danach wurden die Gewebeschnitte nochmals zwei Minuten mit Aqua dest. gewaschen. Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte in *Faramount Aqueous Mounting Medium* (Dako S3025) eingebettet und mit Deckgläsern verschlossen.

Dann wurden die gefärbten Gewebeschnitte mikroskopiert. Dabei wurden mit dem Computerprogramm AxioVision 4.72 elektronische Bilder gemacht.

2.3.3 Auswertung

2.3.3.1 Immunhistochemische Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung erfolgte anhand eines *Scoring* Modells. Hierbei fanden die Expressionsstärke (*Score 1*) und die Anzahl positiver Zellen (*Score 2*) Berücksichtigung (siehe Tabelle 5). Die Expressionsstärke wurde mit *Scores* von 0 (keine Expression), 1 (schwache Expression), 2 (mäßigergradige Expression) und 3 (starke Expression) bewertet. Für die Bewertung der Anzahl positiver Zellen diente eine prozentuale Einteilung, bei der *Scores* von 0 (0%), 1 (1-25%), 2 (26-50%), 3 (51-75%) und 4 (76-100%) verwendet wurden. Durch Multiplikation des für die Expressionsstärke vergebenen *Score* (*Score 1*) mit dem für die Zahl der positiven Zellen vergebenen *Score* (*Score 2*) wurde dann der *Gesamt-Score* (*Immunreaktiver Score* (IRS)) gebildet. Anhand dieser Vorgehensweise wurden sämtliche Gewebeschnitte unter dem Mikroskop bewertet. Die Ergebnisse der vergebenen *Scores* wurden in repräsentativen Stichproben von einem Pathologen des Universitätsklinikums Düsseldorf überprüft.

Tabelle 5: Scoring-Modell für die immunhistochemische Auswertung
(angelehnt an (Remmele and Stegner 1987))

Auswertungskriterien									
Expressionsstärke Score 1	0	1	2	3					
	Keine Expression	Schwache Expression	Mäßiggradige Expression	Starke Expression					
Zahl positiver Zellen Score 2	0	1	2	3	4				
	0%	1-25%	26-50%	51-75%	76- 100%				
Gesamt-Score (IRS) Score 1 x Score 2	0	1	2	3	4	6	8	9	12

2.3.3.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Prism5 und Microsoft Excel 2010. Zur Varianzanalyse ist der Anova Test angewendet worden. Das Signifikanzniveau ist auf $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Expression von Molekülen des Wnt-Signalwegs beim gesunden humanen Pankreasgewebe

Zunächst wurden im Rahmen dieser Arbeit die im Kapitel Material und Methoden aufgeführten Antikörper gegen Wnt4, Wnt3a, Frizzled und TCF7L2 beim gesunden humanen Pankreasgewebe immunhistochemisch etabliert. Dabei zeigte sich, dass Wnt4, Wnt3a, Frizzled und TCF7L2 beim normalen humanen endokrinen Pankreasgewebe exprimiert werden. Die Ergebnisse dieser immunhistochemischen Untersuchung sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Antikörperetablierung beim gesunden Pankreasgewebe

Spezifität	Spezies	Verdünnung	Ergebnis
Wnt4	Kaninchen	1:25	++
Wnt3a	Kaninchen	1:25	+
Frizzled	Kaninchen	1:25	+
TCF7L2	Kaninchen	1:25	(+)

Stark positive Expression: ++ , positive Expression: +, schwach positive Expression: (+).

3.1.1 Expression von Wnt4 beim gesunden humanen Pankreasgewebe

Der Wnt-Rezeptorligand Wnt4 konnte durch Färbung des gesunden humanen Pankreasgewebes mit dem spezifischen polyklonalen Antikörper mit einer Verdünnung von 1:25 immunhistochemisch positiv nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine starke Expression in den pankreatischen Inselzellen (siehe Abb. 11).

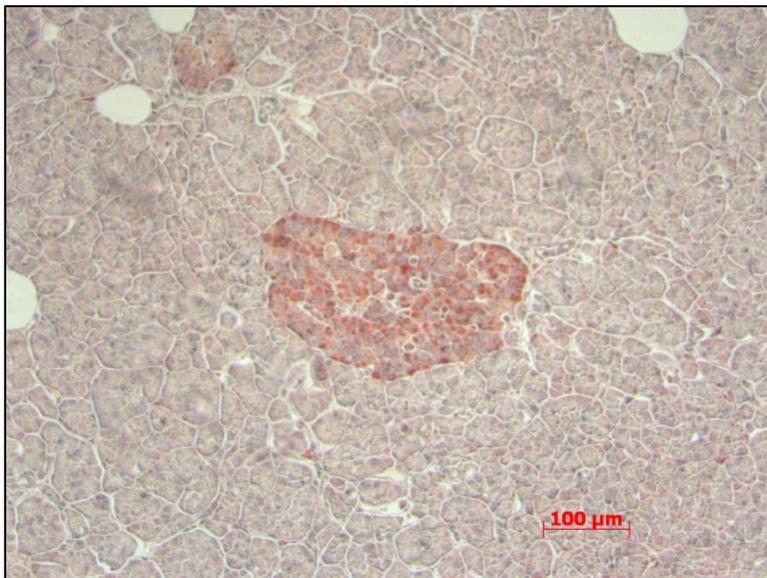


Abb. 11: Expression von Wnt4 in pankreatischen Inseln
10 fache Vergrößerung

3.1.2 Expression von Wnt3a beim gesunden humanen Pankreasgewebe

Durch Färbung mit dem spezifischen polyklonalen Antikörper mit einer Verdünnung von 1:25 konnte der Wnt-Rezeptorligand Wnt3a beim gesunden humanen Pankreasgewebe immunhistochemisch nachgewiesen werden (siehe Abb. 12). Im Vergleich zu Wnt4 war die Expression in den pankreatischen Inselzellen jedoch weniger stark ausgeprägt.



Abb. 12: Expression von Wnt3a in pankreatischen Inseln
40fache Vergrößerung

3.1.3 Expression von Frizzled beim gesunden humanen Pankreasgewebe

Mittels spezifischem polyklonalen Antikörper mit einer Verdünnung von 1:25 wurde das Rezeptorprotein Frizzled immunhistochemisch beim gesunden humanen Pankreasgewebe nachgewiesen (siehe Abb. 13). Frizzled wurde dabei eher schwach exprimiert.

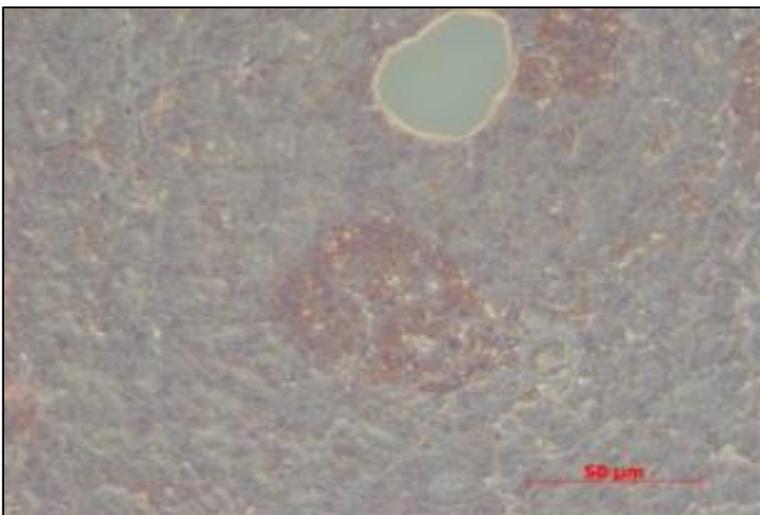


Abb. 13: Expression von Frizzled in pankreatischen Inseln
20fache Vergrößerung

3.1.4 Expression von TCF7L2 beim gesunden humanen Pankreasgewebe

Der Transkriptionsfaktor TCF7L2 konnte durch Färbung mit dem monoklonalen spezifischen Antikörper mit einer Verdünnung von 1:25 beim gesunden humanen Pankreasgewebe etabliert werden. Es zeigte sich allerdings lediglich eine schwache Expression (siehe Abb. 14).

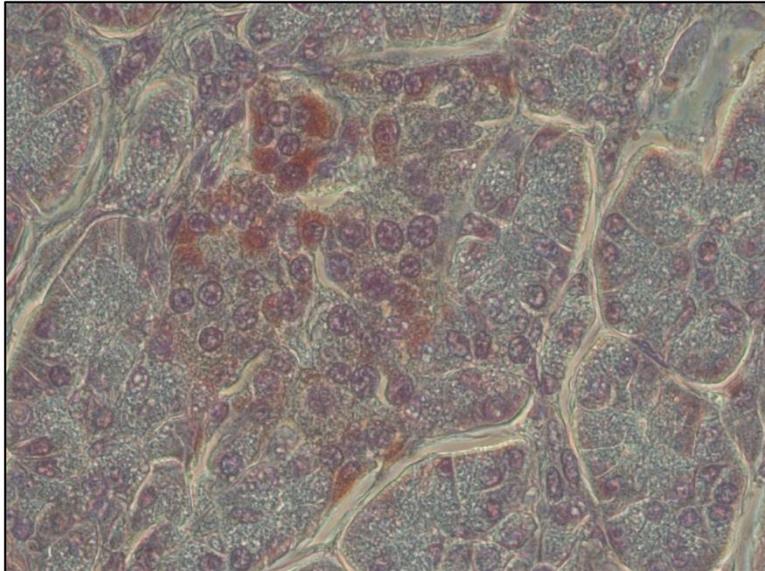


Abb. 14: Expression von TCF7L2 in pankreatischen Inseln
40fache Vergrößerung

3.2 Expression von Molekülen des Wnt-Signalwegs beim humanen Insulinom

3.2.1 Expression von Wnt4 beim humanen Insulinom

Durch Färbung mit dem spezifischen polyklonalen Antikörper mit einer Verdünnung von 1:25 konnte Wnt4 beim Insulinom nachgewiesen werden. Es wurde festgestellt, dass die Expression von Wnt4 in der Kontrollgruppe – also beim gesunden humanen Pankreasgewebe – stärker ist als beim Insulinom. Weiter zeigte sich bei den benignen Insulinomen eine stärkere Expression von Wnt4 als bei den malignen Insulinomen. Der immunreaktive *Score* betrug bei den benignen Insulinomen $4,51 \pm 2,70$ ($p < 0,05$), bei den malignen Insulinomen $2,67 \pm 1,83$ ($p < 0,05$) und in der Kontrollgruppe $7,5 \pm 3$ (siehe Abb. 15).

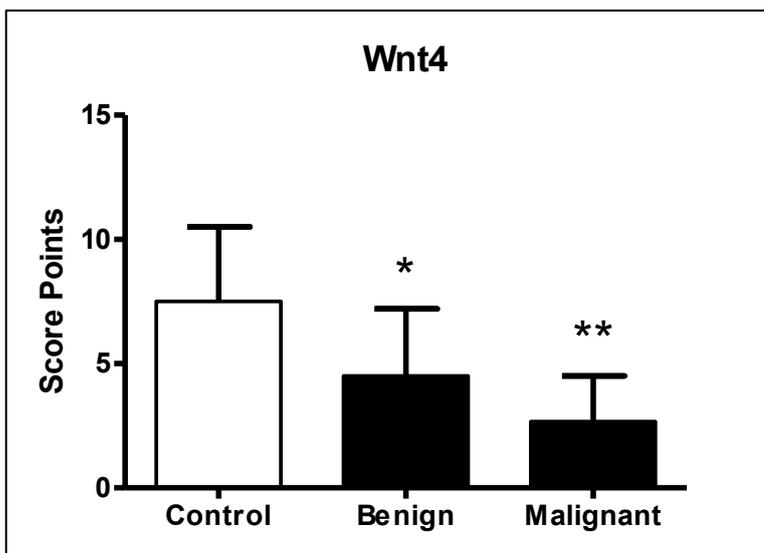


Abb. 15: Auswertung der Expression von Wnt4 beim Insulinom

In der Kontrollgruppe wurde eine stärkere Wnt4-Expression festgestellt als beim humanen Insulinom (benigne: $4,51 \pm 2,70$, $p < 0,05$, maligne $2,67 \pm 1,83$, $p < 0,05$, Kontrollgruppe: $7,5 \pm 3$), $n=61$.

Abb. 16 zeigt exemplarisch die schwach ausgeprägte Expression von Wnt4 beim malignen Insulinom.

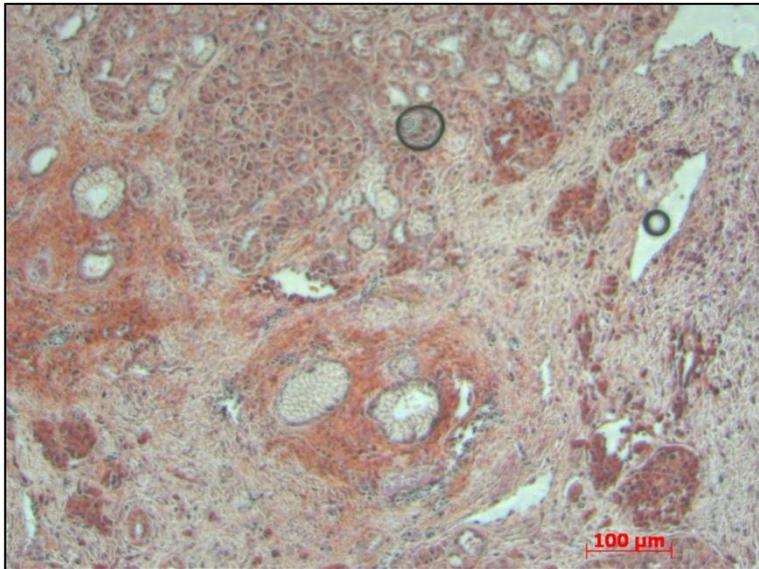


Abb. 16: Schwache Expression von Wnt4 beim malignen Insulinom
10fache Vergrößerung

Im Vergleich dazu zeigt Abb. 17 exemplarisch die Expression von Wnt4 beim als Kontrolle gefärbten gesunden humanen Pankreasgewebe. Es ist eine deutlich stärkere Expression von Wnt4 zu erkennen als beim Insulinom.

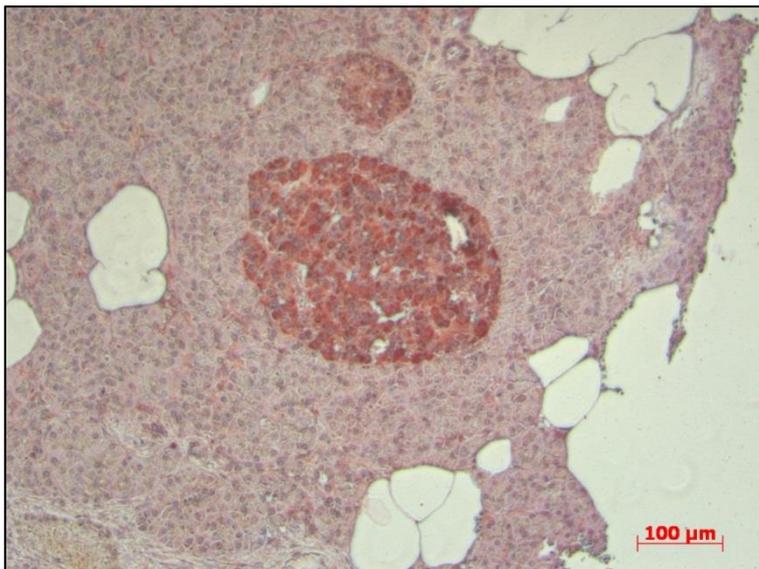


Abb. 17: Starke Expression Wnt4 beim gesunden Pankreasgewebe
Positivkontrolle, 10fache Vergrößerung

3.2.2 Expression von Wnt3a beim humanen Insulinom

Durch Färbung mit dem spezifischen polyklonalen Antikörper mit einer Verdünnung von 1:25 konnte Wnt3a bei den Insulinomen nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine starke Überexpression von Wnt3a beim Insulinom im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei wurde Wnt3a bei den benignen Insulinomen deutlich stärker exprimiert als bei den malignen Insulinomen. Der immunreaktive Score betrug bei den benignen Insulinomen $7,59 \pm 3,2$ ($p < 0,05$), bei den malignen Insulinomen $3,39 \pm 2,6$ (n.s.) und in der Kontrollgruppe $2,5 \pm 0,57$ (siehe Abb. 18).

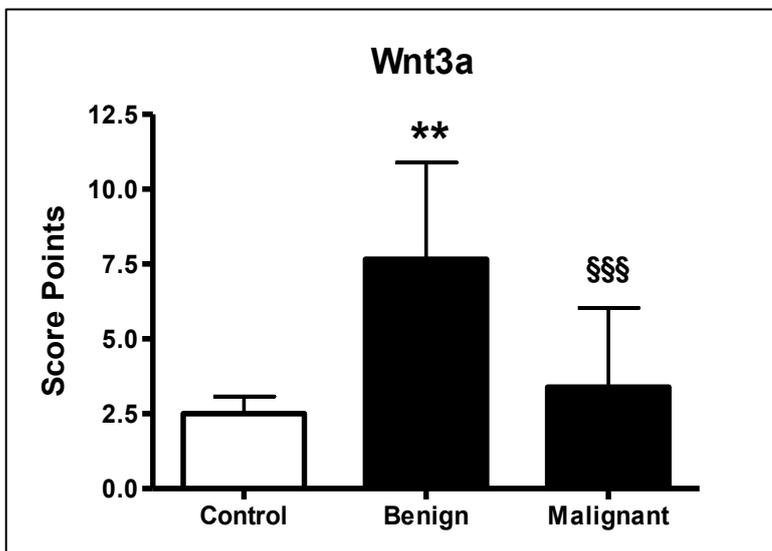


Abb. 18: Auswertung der Expression von Wnt3a beim Insulinom

Der extrazelluläre Ligand Wnt3a zeigt eine starke Überexpression beim humanen Insulinom (benigne: $7,59 \pm 3,2$, $p < 0,05$, maligne $3,39 \pm 2,6$, n.s., Kontrollgruppe $2,5 \pm 0,57$), $n=61$.

Auf Abb. 19 ist exemplarisch die Überexpression von Wnt3a bei einem benignen humanen Insulinom zu erkennen. Abb. 20 zeigt exemplarische die deutlich schwächere Expression von Wnt3a beim gesunden humanen Pankreasgewebe.

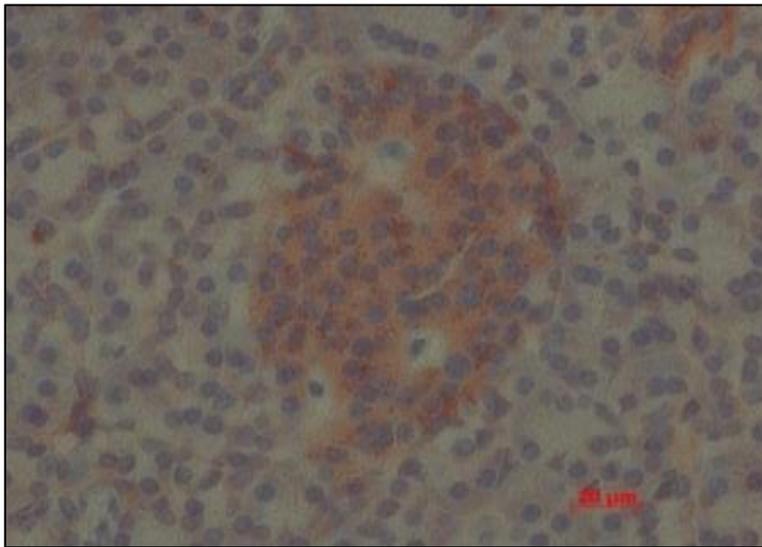


Abb. 19: Expression von Wnt3a beim benignen Insulinom
40fache Vergrößerung

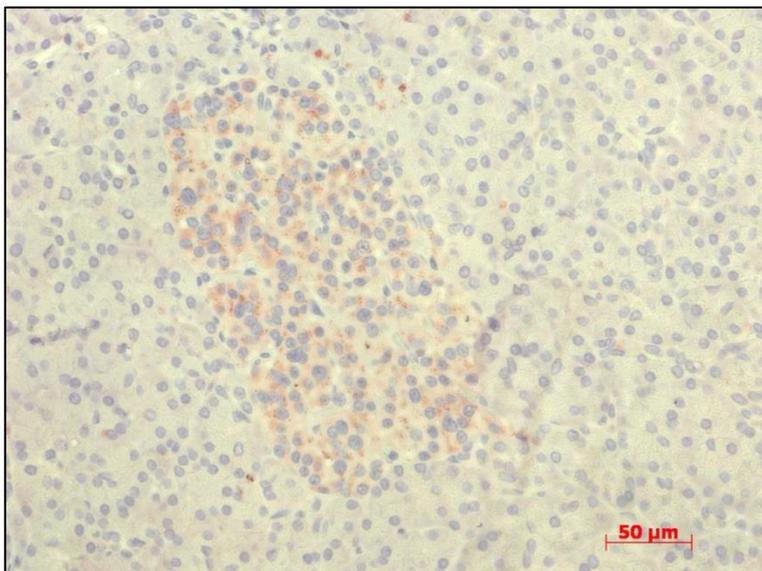


Abb. 20: Expression von Wnt3a beim gesunden Pankreasgewebe
Positivkontrolle, 20fache Vergrößerung

3.2.3 Expression von Frizzled beim humanen Insulinom

Durch Färbung mit dem spezifischen polyklonalen Antikörper mit einer Verdünnung von 1:25 konnte Frizzled bei den Insulinomen nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass Frizzled beim Insulinom im Vergleich zur Kontrollgruppe überexprimiert wird. Die Expression von Frizzled war dabei sowohl bei den benignen als auch bei den malignen Insulinomen ähnlich stark ausgeprägt und in beiden Fällen signifikant, anders als dies bei der Expression von Wnt3a erkennbar war. Der immunreaktive Score betrug bei den benignen Insulinomen $6,19 \pm 3,41$ ($p < 0,05$), bei den malignen Insulinomen $5,47 \pm 1,84$ ($p < 0,05$) und in der Kontrollgruppe $1,5 \pm 0,57$ (siehe Abb. 21).

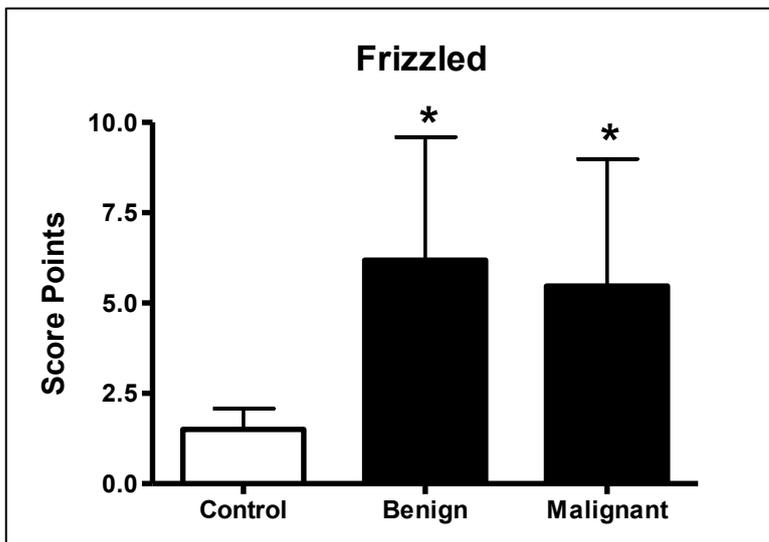


Abb. 21: Auswertung der Expression von Frizzled beim Insulinom

Es zeigte sich eine Überexpression von Frizzled beim humanen Insulinom im Vergleich zur Kontrollgruppe (benigne: $6,19 \pm 3,41$, $p < 0,05$, maligne: $5,47 \pm 1,84$, $p < 0,05$, Kontrollgruppe: $1,5 \pm 0,57$), $n=61$.

Auf Abb. 22 ist zu erkennen, dass Frizzled beim benignen humanen Insulinom überexprimiert wird. Die Inselzellen sind in dieser Abbildung deutlich erkennbar.

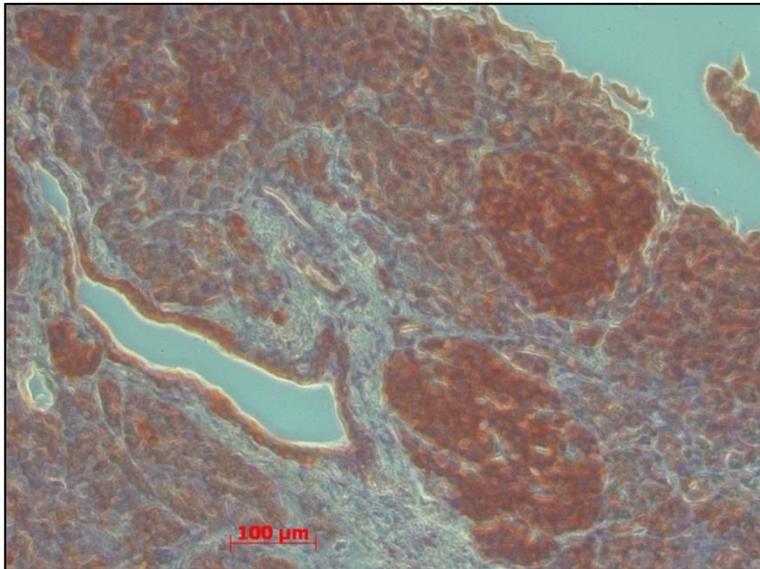


Abb. 22: Überexpression von Frizzled beim benignen Insulinom
20fache Vergrößerung

Im Vergleich dazu zeigt Abb. 23 die schwache Expression von Frizzled beim gesunden humanen Pankreasgewebe.

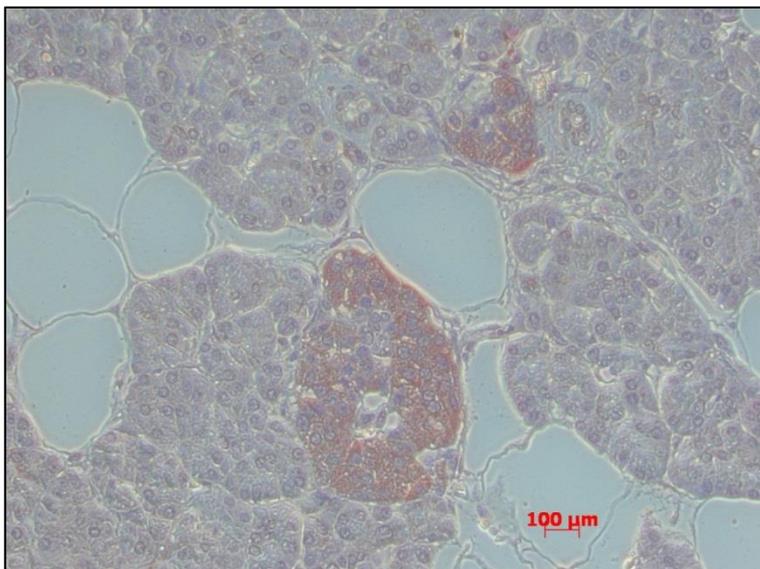


Abb. 23: Expression von Frizzled beim gesunden Pankreasgewebe
Positivkontrolle, 20fache Vergrößerung

3.2.4 Expression von TCF7L2 beim humanen Insulinom

Durch Färbung mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper mit einer Verdünnung von 1:25 konnte TCF7L2 bei den Insulinomen nicht nachgewiesen werden; TCF7L2 wurde bei den Insulinomen nicht exprimiert (siehe Abb. 24). Auch wenn TCF7L2 bei den im ersten Schritt vorab gefärbten Schnitten mit gesundem humanen Pankreasgewebe noch etabliert werden konnte (siehe Kapitel 3.1.4), zeigte sich nun auch bei dem als Kontrolle gefärbten gesunden humanen Pankreasgewebe keine Expression von TCF7L2 mehr.

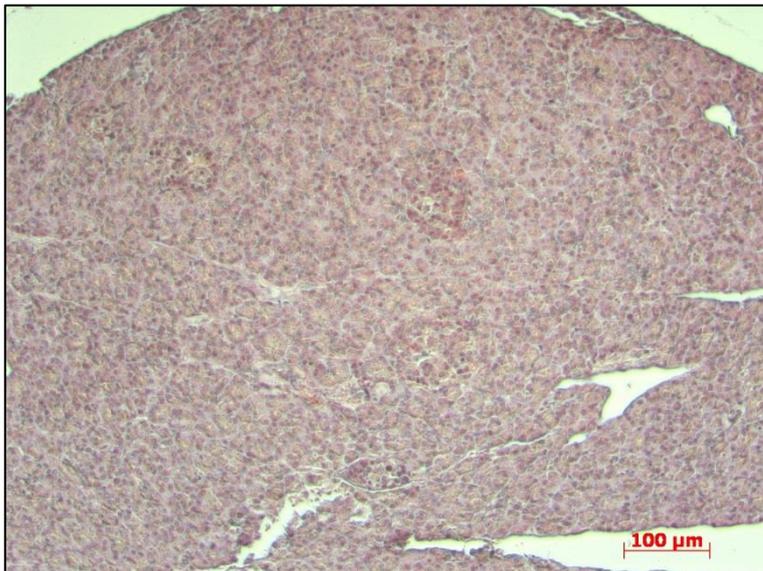


Abb. 24: Keine Expression von TCF7L2 beim malignen Insulinom
10fache Vergrößerung

4 Diskussion

4.1 Vergleichende Betrachtung der untersuchten Insulinome

Insulinome sind ganz überwiegend benigne und nur weniger als 10 % sind maligne (Grant 2005, Oberg 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Insulinome waren ebenfalls überwiegend benigne, jedoch waren 10 von 61 Fällen (16,39%) maligne. In der Literatur wird beschrieben, dass nur 5% aller Insulinome Metastasen zeigen (Oberg 2010). Jedoch wiesen hier sämtliche der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten malignen Insulinome Metastasen auf. Die Metastasen beim Insulinom befinden sich üblicherweise in der Leber oder in den regionalen Lymphknoten (Oberg 2010). In Übereinstimmung damit befanden sich die Metastasen bei den hier untersuchten Insulinomen in allen Fällen in der Leber und/oder in den Lymphknoten.

Der relativ betrachtet größte Teil der untersuchten Insulinome (44,26%) befand sich im Pankreasschwanz; im Pankreaskörper und im Pankreaskopf befanden sich 27,87% bzw. 24,59% der Insulinome. Damit wich die Lokalisation bei der untersuchten Kohorte etwas von der in der Literatur beschriebenen Verteilung von je 1/3 auf Pankreaskopf, -körper, und -schwanz (Oberg 2010, Jensen, Cadiot et al. 2012) ab.

Von den untersuchten Insulinomen waren 29,51% bis 1 cm und 67,21% zwischen 1-5 cm groß, 3,27% waren größer als 7 cm. Damit wiesen die untersuchten Insulinome im Vergleich zur Studienlage (Oberg 2010) zu einem größeren Teil eine Größe zwischen 1-5 cm und zu einem geringeren Teil eine Größe von weniger als 1 cm auf und waren übereinstimmend nur in seltenen Fällen größer als 5 cm. Nach der Studienlage ist die Inzidenz eines Insulinoms bei Frauen leicht höher als bei Männern (Jensen, Cadiot et al. 2012). Auch von der untersuchten Kohorte waren mehr Frauen als Männer an einem Insulinom erkrankt, allerdings überwog der Anteil der erkrankten Frauen doch deutlich und lag bei 67,21%.

4.2 Überexpression von Wnt3a beim humanen Insulinom

Der Wnt-Rezeptorligand Wnt3a spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulation verschiedener Zellfunktionen, so wie bei der Proliferation und Differenzierung bei verschiedenen Stammzellen (He, Lu et al. 2015). Das Wnt3a-Gen induziert die Akkumulation von beta-Catenin, wodurch der kanonische Wnt-Signalweg aktiviert wird (Katoh and Katoh 2005). Der Wnt-Signalweg spielt eine Rolle bei der Tumorentstehung in verschiedenen Geweben (Polakis 2000, Logan and Nusse 2004). Es konnte gezeigt werden, dass eine aberrante Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs bei einem breiten Spektrum von Tumorarten beteiligt ist (Barker, Ridgway et al. 2009, Chan, Mak et al. 2012, Yang 2014) und dass beta-Catenin eine entscheidende Rolle für die Regulation der Wnt-Zielgene spielt (Chan, Mak et al. 2012). Die nukleäre Akkumulation von beta-Catenin stellt einen Biomarker für die Tumorprognose dar (Chocarro-Calvo, Garcia-Martinez et al. 2013).

Bonci et al. konnten zeigen, dass Wnt3a stark exprimiert wird beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom (Bonci, Coppola et al. 2008) wie auch beim humanen Magenkarzinom in der 44As3-Zelle mit hohem metastatischem Potenzial (Takei, Takigahira et al. 2011) und beim *activating transcription factor* (ATF)-3-induzierten Mammakarzinomen (Yan, Della Coletta et al. 2011). Davor konnte bereits in einer anderen Studie festgestellt werden, dass Wnt3a – neben fünf weiteren Wnt-Rezeptorliganden, darunter auch Wnt4 – in den meisten Brustkrebszelllinien überexprimiert ist (Benhaj, Akcali et al. 2006). In normalen humanen Mammaepithelzellen hingegen wurde Wnt3a nicht signifikant exprimiert, obwohl dort viele Wnt-Rezeptorliganden exprimiert waren. Es wurde zudem eine nukleäre Akkumulation von beta-Catenin und eine Zyklin-D1-Induktion in Brustkrebszelllinien, nicht aber in normalen humanen Mammaepithelzellen beobachtet. Diese Beobachtungen legen das Vorliegen einer Liganden-abhängigen kanonischen Wnt-Signalaktivität beim humanen Brustkrebs nahe (Benhaj, Akcali et al. 2006).

Auch beim oralen Plattenepithelkarzinom wurde eine im Vergleich zu nicht malignen Kontrollen erhöhte Expression von Wnt3a beobachtet (Andrade Filho, Letra et al. 2011).

Die Expression von Wnt3a wird in Verbindung gebracht mit dem klinischen Grad und der Aggressivität von Gliomen und Wnt3a ist überexprimiert bei Gliomstammzellen (Kaur, Chettiar et al. 2013). Pan et al. stellten fest, dass Wnt3a beim hepatozellulären Karzinom (HCC) signifikant überexprimiert ist. Dies impliziert, dass die abnormale Expression von Wnt3a an der Entwicklung und dem Verlauf von HCC beteiligt ist und dass Wnt3a als neuer Biomarker für die Diagnose von HCC geeignet ist. Wnt3a zeigte sich mit einer höheren Sensitivität und einer niedrigeren Falsch-Positiv-Rate gegenüber dem bekannten Tumormarker alpha-Fetoprotein (AFP) überlegen. Die Kombination von Wnt3a und AFP zeigte einen ergänzenden Diagnosewert mit einer Erhöhung der Sensitivität auf 96,25% für die HCC-Diagnose, was deutlich höher war als Wnt3a oder AFP jeweils für sich alleine zur Unterscheidung von Malignität und benignen Leberläsionen (Pan, Yao et al. 2016).

Qi et al. zeigten, dass die Wnt3a-Expression bei Kolonkarzinomen erhöht ist und mit dem klinischen Outcome der Patienten korreliert. Es wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Wnt3a und der histologischen Differenzierung, klinischen Stadien, Metastasen und Rezidiven beobachtet. Es wurde gezeigt, dass das Level der Wnt3a-Expression sich mit geringen Differenzierungsgraden erhöhte. Dies legt den Schluss nahe, dass der Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle beim Verlauf von Kolonkarzinomen spielt. Weiter wurde gezeigt, dass die Wnt3a-Expression mit der Expression der Epithelial-Mesenchymal-Transition (EMT)-assoziierten Marker E-Cadherin, Vimentin und nukleärem beta-Catenin korreliert. Diese Daten zeigten die Rolle von Wnt3a als möglichem Aktivator des kanonischen Wnt-Signalwegs und als beteiligtem Regulator bei der Tumorprogression beim Kolonkarzinom. Dadurch wurde gezeigt, dass die Expression von Wnt3a assoziiert ist mit EMT und die Kolonkarzinomprogression fördert (Qi, Sun et al. 2014).

Heller et al. beobachteten zudem, dass das Hinzufügen von rekombinantem Wnt3a *in vitro* die Proliferation von INS-1-Zellen auf 151,2 % bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe induzierte. Auf funktionaler Ebene stimuliert also Wnt3a die Proliferation von Insulinomzellen (Heller et al., *unpublished paper*).

Dies wirft die Frage auf, ob Wnt3a in Insulinomzellen überexprimiert wird und möglicherweise mit dem Grad der Entdifferenzierung korreliert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass Wnt3a beim humanen Insulinom stark überexprimiert wird. Der immunreaktive Score betrug bei den untersuchten benignen Insulinomen $7,59 \pm 3,2$ ($p < 0,05$) und bei den untersuchten malignen Insulinomen $3,39 \pm 2,6$ (n.s.). In der Kontrollgruppe betrug der immunreaktive Score dagegen nur $2,5 \pm 0,57$ (siehe Abb. 18). Diese Überexpression steht auch in Übereinstimmung mit der dargestellten Studienlage zur Expression von Wnt3a bei verschiedenen Tumorarten. Vor diesem Hintergrund liegt es nahe, dass eine dysregulierte Wnt-Signalaktivität bei der Entwicklung von Insulinomen beteiligt ist.

Allerdings zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit keine erhöhte Expression von Wnt3a beim malignen Insulinomen verglichen mit benignen Insulinomen. Dies impliziert, im Unterschied zu den genannten Studien, dass beim humanen Insulinom aus dem Grad der Expression von Wnt3a kein Rückschluss auf die Malignität möglich ist und Wnt3a daher nicht als Marker für die Malignität eines humanen Insulinoms verwendet werden kann.

4.3 Überexpression von Frizzled beim humanen Insulinom

Die Rolle von Frizzled bei der Entstehung von Tumoren wurde in verschiedenen Studien untersucht. Holcombe et al. zeigten, dass beim humanen Kolonkarzinom die Expression von Frizzled 1/2 mit den Prozessen der Tumorausbreitung assoziiert ist und eine veränderte Expression dieser Frizzled-Rezeptoren möglicherweise nützlich als prognostischer und diagnostischer Marker für Patienten mit Kolonkarzinom sein kann. So wurden Frizzled 1/2-Rezeptoren in der gesunden Mukosa des Kolons und in hochdifferenzierten

Tumoren des Kolons nicht exprimiert. Schlecht differenzierte Kolontumoren hingegen zeigten eine hohe Expression der vorgenannten Frizzled-Rezeptoren (Holcombe, Marsh et al. 2002).

Wang et al. zeigten, dass Frizzled 8 in humanem Lungentumorgewebe und humanen Lungentumorzelllinien überexprimiert wird. Der *shRNA-Knockdown* von Frizzled 8 inhibierte die Proliferation der Lungentumorzellen und gleichzeitig die Aktivität des Wnt-Signalwegs *in vitro* und supprimierte das Tumorwachstum *in vivo*. Weiter führte der *shRNA-Knockdown* von Frizzled 8 zu einer höheren Sensitivität der Lungentumorzellen für eine Chemotherapie. Diese Daten legen nahe, dass Frizzled 8 ein mögliches therapeutisches Ziel für humane Lungentumoren und die Überexpression von Frizzled 8 wichtig für die aberrante Aktivierung des Wnt-Signalwegs bei Lungentumoren ist (Wang, Xu et al. 2012).

Verschiedene Frizzled-Rezeptoren sind bei humanen Intestinaltumoren und – zelllinien überexprimiert, beispielsweise Frizzled 3, Frizzled 6 und Frizzled 7 (Vincan 2004, Vincan, Darcy et al. 2007). Zwischen 40% und 70% der HCC zeigten erhöhtes nukleäres beta-Catenin (Wong, Fan et al. 2001). Merle et al. zeigten eine häufige Überexpression von Frizzled 7 bei HCC. Dabei wurde beobachtet, dass diese Überexpression von Frizzled 7 bereits im frühen Krankheitsstadium vorliegt, die beta-Catenin-Level stabilisiert und zu einer erhöhten Tumorzellmigration beiträgt (Merle, de la Monte et al. 2004). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass der kanonische Wnt-Signalweg eine wichtige Rolle bei HCC spielen könnte. In einer späteren Studie stellten Bengochea et al. – neben einer Hochregulation von Frizzled 7 – auch eine häufige Hochregulation von Frizzled 3 und 6 beim humanen HCC fest (Bengochea, de Souza et al. 2008).

Tiwarly und Xu fanden heraus, dass ein hoher Level von Frizzled 7 mit einem erhöhten metastatischen Potenzial von Melanomzelllinien korreliert. Der *Knockdown* von Frizzled 7 in Melanomzelllinien führte im Tiermodell zu einer signifikanten Verringerung der Metastasen in der Lunge. Dies spricht dafür, dass Frizzled 7 eine kausale Rolle während der Metastasenbildung spielt. Es

wurde gezeigt, dass Frizzled 7 erforderlich ist für die Tumorentstehung von Melanomzellen *in vitro* und für die Initiierung des Metastasenwachstums von Melanomzellen und die Proliferation von Melanomzellen während des Wachstums der Metastasen (Tiwary and Xu 2016).

Verschiedene Studien zeigen eine Hochregulation von Frizzled 7 beim Magenkarzinom, wobei eine hohe Expression assoziiert ist mit einem schlechten klinischen *Outcome* (Kirikoshi, Sekihara et al. 2001, To, Chan et al. 2001, Schmuck, Warneke et al. 2011).

Auch beim dreifach negativen Mammakarzinom wurde eine Überexpression von Frizzled 7 beobachtet. Dabei wurde aus den Ergebnissen geschlossen, dass Frizzled 7 die Zelltumorgenese über den kanonischen Wnt-Signalweg reguliert (Yang, Wu et al. 2011). Eine Hochregulation von Frizzled 7 wurde weiter beim ösophagealen Karzinom (Tanaka, Akiyoshi et al. 1998), beim nasopharyngealen Karzinom (Zeng, Zhou et al. 2007) und bei humanen Glioblastomstammzellen (Sandberg, Altschuler et al. 2013) beobachtet.

Lu et al. berichteten über eine hohe Expressionsstärke von Frizzled 3 bei chronischer lymphatischer Leukämie (CLL) (Lu, Zhao et al. 2004).

Pasca di Magliano et al. beobachteten eine Überexpression von Frizzled 2, 7 und 9 beim humanen duktalem Adenokarzinom des Pankreas verglichen mit gesundem Pankreasgewebe (Pasca di Magliano, Biankin et al. 2007).

Übereinstimmend mit dieser vorstehend beschriebenen Studienlage wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Überexpression von Frizzled beim humanen Insulinom im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Der immunreaktive *Score* betrug bei den untersuchten benignen Insulinomen $6,19 \pm 3,41$ ($p < 0,05$), bei den untersuchten malignen Insulinomen $5,47 \pm 1,84$ ($p < 0,05$) und in der Kontrollgruppe nur $1,5 \pm 0,57$ (siehe Abb. 21). Dies unterstützt die Vermutung, dass der kanonische Wnt-Signalweg bei der Entwicklung von Insulinomen beteiligt ist. Frizzled war dabei sowohl bei den benignen als auch bei den

malignen Insulinomen ähnlich stark exprimiert. Beim humanen Insulinom ist daher die Expressionsstärke kein Indiz für die Malignität.

4.4 Keine Überexpression von Wnt4 beim humanen Insulinom

In einer Vielzahl von Studien wurde die Expression von Wnt4 in verschiedenen Tumorgeweben untersucht.

Beim Magenkarzinom konnten Volkomorov et al. bei der Analyse des gesamten Patientenkollektivs keine signifikanten Unterschiede in der Expressionsstärke von Wnt4 im Vergleich zum gesunden Gewebe feststellen. Zudem gab es keine signifikante Verbindung der Expressionsstärke von Wnt4 und der Tumordifferenzierung, dem Stadium und dem Vorliegen von Metastasen. Bei einer Unterteilung der Patienten nach dem jeweiligen histologischen Typ wurde jedoch beobachtet, dass Wnt4 beim intestinalen Typ des Magenkarzinoms im Vergleich zur normalen Mukosa signifikant herunterreguliert ist (Volkomorov, Grigoryeva et al. 2013).

Bei Leukämie-abgeleiteten Zelllinien und Blasten von Patienten mit Leukämie wurde eine stark reduzierte Wnt4-Expression gezeigt. Es wurde berichtet, dass bei Leukämie zum einen rekombinantes humanes Wnt4 die Zellviabilität und zum anderen die Wiederherstellung von Wnt4 das Zellwachstum von Leukämie-abgeleiteten Zelllinien in einer nicht-kanonischen Weise inhibiert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Wnt4 eine Rolle in der Regulierung des Zellwachstums von Leukämie-abgeleiteten Zellen spielt, in dem es Zellen in der G1-Zellzyklusphase in einer Frizzled 6-unabhängigen Weise anhält, und dass Wnt4 bei Leukämie als Antagonist des kanonischen Wnt-Signalweg agiert (Garcia-Castro, Alvarez-Zavala et al. 2013).

Auch andere Studien zeigen, dass Wnt4 in verschiedenen Zelltypen durch den nicht kanonischen Signalweg agiert, so zum Beispiel bei beta-Zellen (Heller, Kuhn et al. 2011) oder beim humanen Hypophysenadenom (Miyakoshi, Takei et al. 2008).

Eine schwache Expression von Wnt4 wurde zudem beim humanen Endometriumkarzinom (Bui, Zhang et al. 1997) und beim humanen Plattenepithelkarzinom (Taki, Kamata et al. 2003) beobachtet. Eine Herunterregulierung von Wnt4 wurde auch beim humanen anaplastischen Schilddrüsenkarzinom gezeigt (De Menna, D'Amato et al. 2013).

In Übereinstimmung damit berichteten Lu et al., dass Wnt4-Level bei Patienten mit CLL reduziert sind verglichen mit gesunden B-Zellen (Lu, Zhao et al. 2004). Memarian et al. stellten dagegen eine verstärkte Expression bei Patienten mit CLL fest (Memarian, Hojjat-Farsangi et al. 2009), während sie diese Differenzierung bei Patienten mit akuter lymphatische Leukämie nicht feststellen konnten (Memarian, Vosough et al. 2012).

Miyakoshi et al. berichteten, dass Wnt4 beim GH-Adenom, beim PRL-Adenom und beim TSH-Adenom überexprimiert wird (Miyakoshi, Takei et al. 2008). In Übereinstimmung damit beobachteten Li et al. eine Überexpression von Wnt4 bei humanen Hypophysenadenomen mit Ausnahme von ACTH-Adenomen. Sie schlussfolgerten, dass eine Wnt4-Deregulation zur Tumorgenese bei Hypophysenadenomen beitragen könnte. Bei ACTH-Adenomen wurden dagegen nur niedrige Wnt4-Level beobachtet, die vergleichbar mit dem Wnt4-Level bei gesundem Hypophysengewebe sind. In Bezug auf die Ursache für die unterschiedliche Expressionsstärke von Wnt4 bei ACTH-Adenomen auf der einen Seite und den anderen fünf untersuchten Arten von Hypophysenadenomen (FSH-Adenome, GH-Adenome, PRL-Adenome, TSH-Adenome, NF-Adenome) auf der anderen Seite wird spekuliert, dass der Ursprung dieser Adenome aus verschiedenen Zelllinien des Hypophysenvorderlappens eine Rolle spielt (Li, Zhang et al. 2014).

Beim humanen Mammakarzinom wurde berichtet, dass Wnt4 in den meisten Brustzelllinien überexprimiert ist (Benhaj, Akcali et al. 2006). Eine Überexpression von Wnt4 beim Mammakarzinom wurde auch von Vouyovitch et al. gezeigt (Vouyovitch, Perry et al. 2016). Auch beim humanen HCC liegt eine Überexpression von Wnt4 vor (Bengochea, de Souza et al. 2008).

Zudem beobachteten Pasca di Magliano et al. eine Überexpression unter anderem von Wnt4 beim humanen duktalem Adenokarzinom des Pankreas. Sie kamen durch die Gesamtergebnisse der Studie zu der Schlussfolgerung, dass hierbei eine erhöhte Aktivität des kanonischen Wnt-Signalwegs besteht (Pasca di Magliano, Biankin et al. 2007).

Wie vorstehend dargestellt, ist die Studienlage zur Expression von Wnt4 uneinheitlich. Abhängig vom jeweiligen Tumorgewebe wurde eine erhöhte, eine reduzierte oder eine unveränderte Expression von Wnt4 verglichen mit gesundem Gewebe beobachtet. Auch hinsichtlich der Aktivierung des kanonischen bzw. des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs durch Wnt4 gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Im Rahmen dieser Arbeit konnte beim humanen Insulinom eine Überexpression von Wnt4 nicht festgestellt werden. Der immunreaktive Score betrug bei den untersuchten benignen Insulinomen $4,51 \pm 2,70$ ($p < 0,05$) und bei den untersuchten malignen Insulinomen $2,67 \pm 1,83$ ($p < 0,05$), während er in der Kontrollgruppe $7,5 \pm 3$ betrug (siehe Abb. 15). Damit war Wnt4 beim gesunden humanen Pankreasgewebe der Kontrollgruppe stärker exprimiert als beim humanen Insulinom, was eine Herunterregulierung von Wnt4 beim Insulinom zeigt.

4.5 Physiologische Bedeutung von Wnt4 in Bezug auf die pankreatische beta-Zelle

Krützfeld und Stoffel konnten zeigen, dass in adulten pankreatischen Inselzellen der Maus *in vivo* der kanonische Wnt-Signalweg trotz Vorliegen von Adipositas und Hyperinsulinämie nicht aktiviert ist (Krützfeldt and Stoffel 2010). Dieses Ergebnis überraschte, da der kanonische Wnt-Signalweg durch Adipozyt-abgeleitete Wnt-Signalmoleküle (Schinner, Ulgen et al. 2008) und hohe Insulinspiegel (Yi, Sun et al. 2008) aktiviert werden kann. Krützfeld und Stoffel identifizierten Wnt4 als abundantes Wnt-Signalmolekül bei adulten pankreatischen Inselzellen. Es wurde eine starke Hochregulation von Wnt4 in pankreatischen Inselzellen von zwei verschiedenen insulinresistenten

Mausmodellen beobachtet. Die erhöhte Expression von Wnt4 inhibierte den kanonischen Wnt-Signalweg bei pankreatischen Inselzellen und MIN6-beta-Zelllinien (Krutzfeldt and Stoffel 2010).

Heller et al. konnten in Übereinstimmung damit zeigen, dass Wnt4 als Antagonist des kanonischen Wnt-Signalwegs in der pankreatischen beta-Zelle wirkt. Es wird angenommen, dass Wnt4 als Modulator der Wnt-Signalresponsivität von pankreatischen beta-Zellen wirken könnte (Heller, Kuhn et al. 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Wnt4 sowohl beim gesunden humanen Pankreasgewebe als auch beim humanen Insulinom exprimiert wird und dass die Expressionsstärke beim humanen Insulinom geringer war im Vergleich zum gesunden humanen Pankreasgewebe.

Unter Berücksichtigung der Befunde von Krutzfeldt und Stoffel, wonach eine erhöhte Expression von Wnt4 in pankreatischen Inselzellen den kanonischen Wnt-Signalweg inhibierte, könnte die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete reduzierte Wnt4-Expression beim humanen Insulinom auch für eine verstärkte Proliferation von pankreatischen beta-Zellen durch Herabregulation von Wnt4 sprechen.

Wnt4 wirkt – abhängig von der Zielzelle, möglicherweise abhängig von dessen Rezeptorbesatz – als Modulator des Wnt-Signalwegs. So könnte die Herabregulation von Wnt4 zur Proliferation von Insulinomen beitragen.

5 Literaturverzeichnis

1. Akerstrom, G. and P. Hellman (2007). "Surgery on neuroendocrine tumours." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **21**(1): 87-109.
2. Alexakis, N., S. Connor, P. Ghaneh, M. Lombard, H. L. Smart, J. Evans, M. Hughes, C. J. Garvey, J. Vora, S. Vinjamuri, R. Sutton and J. P. Neoptolemos (2004). "Hereditary pancreatic endocrine tumours." Pancreatology **4**(5): 417-433; discussion 434-415.
3. Andrade Filho, P. A., A. Letra, A. Cramer, J. L. Prasad, G. P. Garlet, A. R. Vieira, R. L. Ferris and R. Menezes (2011). "Insights from studies with oral cleft genes suggest associations between WNT-pathway genes and risk of oral cancer." J Dent Res **90**(6): 740-746.
4. Anlauf, M. (2011). "Neuroendocrine neoplasms of the gastroenteropancreatic system: pathology and classification." Horm Metab Res **43**(12): 825-831.
5. Anlauf, M., P. Gerlach, M. Schott, A. Raffel, M. Krausch, W. T. Knoefel, M. Pavel and G. Kloppel (2011). "Pathology of neuroendocrine neoplasms." Chirurg **82**(7): 567-573.
6. Anlauf, M., D. Wieben, A. Perren, B. Sipos, P. Komminoth, A. Raffel, M. L. Kruse, C. Fottner, W. T. Knoefel, H. Monig, P. U. Heitz and G. Kloppel (2005). "Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia in 15 adults with diffuse nesidioblastosis: diagnostic criteria, incidence, and characterization of beta-cell changes." Am J Surg Pathol **29**(4): 524-533.
7. Arnold, R. (2005). "Endocrine tumours of the gastrointestinal tract. Introduction: definition, historical aspects, classification, staging, prognosis and therapeutic options." Best Pract Res Clin Gastroenterol **19**(4): 491-505.
8. Barakat, M. T., K. Meeran and S. R. Bloom (2004). "Neuroendocrine tumours." Endocr Relat Cancer **11**(1): 1-18.
9. Barker, N., R. A. Ridgway, J. H. van Es, M. van de Wetering, H. Begthel, M. van den Born, E. Danenberg, A. R. Clarke, O. J. Sansom and H. Clevers (2009). "Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer." Nature **457**(7229): 608-611.
10. Begum, N., S. Maasberg, U. Plockinger, M. Anlauf, A. Rinke, G. Popperl, H. Lehnert, J. R. Izbicki, M. Krausch, Y. K. Vashist, A. Raffel, C. G. Burk, J. Hoffmann, P. Goretzki, U. F. Pape, N. E. T. R. A. C. Weitere Vertreter des deutschen, D. K. Bartsch, W. O. Bechstein, M. W. Buchler, S. Daum, C. Fottner, D. Horsch, A. Hoffmeister, S. Klose, T. Kudlich, H. Lahner, M.

- M. Lerch, H. Monig, T. Musholt, B. Nashan, M. Niedergethmann, S. Noe, D. Quitzsch, F. Scheerer, W. Schepp, F. Weber and C. Wurst (2012). "Neuroendocrine Tumours of the GI Tract - Data from the German NET Registry." Zentralbl Chir.
11. Bengochea, A., M. M. de Souza, L. Lefrancois, E. Le Roux, O. Galy, I. Chemin, M. Kim, J. R. Wands, C. Trepo, P. Hainaut, J. Y. Scoazec, L. Vitvitski and P. Merle (2008). "Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma." Br J Cancer **99**(1): 143-150.
 12. Benhaj, K., K. C. Akcali and M. Ozturk (2006). "Redundant expression of canonical Wnt ligands in human breast cancer cell lines." Oncol Rep **15**(3): 701-707.
 13. Bertolino, P., W. M. Tong, P. L. Herrera, H. Casse, C. X. Zhang and Z. Q. Wang (2003). "Pancreatic beta-cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice." Cancer Res **63**(16): 4836-4841.
 14. Bilimoria, K. Y., J. S. Tomlinson, R. P. Merkow, A. K. Stewart, C. Y. Ko, M. S. Talamonti and D. J. Bentrem (2007). "Clinicopathologic features and treatment trends of pancreatic neuroendocrine tumors: analysis of 9,821 patients." J Gastrointest Surg **11**(11): 1460-1467; discussion 1467-1469.
 15. Bonci, D., V. Coppola, M. Musumeci, A. Addario, R. Giuffrida, L. Memeo, L. D'Urso, A. Pagliuca, M. Biffoni, C. Labbaye, M. Bartucci, G. Muto, C. Peschle and R. De Maria (2008). "The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities." Nat Med **14**(11): 1271-1277.
 16. Brierley, J. D., M. K. Gospodarowicz and C. Wittekind (2016). "TNM Classification of Malignant Tumours." 8th edn. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.
 17. Brunner, E., O. Peter, L. Schweizer and K. Basler (1997). "pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in Drosophila." Nature **385**(6619): 829-833.
 18. Buffet, A., D. Vezzosi, J. C. Maiza, S. Grunenwald, A. Bennet and P. Caron (2013). "Increased plasma beta-hydroxybutyrate levels during the fasting test in patients with endogenous hyperinsulinaemic hypoglycaemia." Eur J Endocrinol **169**(1): 91-97.
 19. Bui, T. D., L. Zhang, M. C. Rees, R. Bicknell and A. L. Harris (1997). "Expression and hormone regulation of Wnt2, 3, 4, 5a, 7a, 7b and 10b in normal human endometrium and endometrial carcinoma." Br J Cancer **75**(8): 1131-1136.

20. Cabrera, C. V., M. C. Alonso, P. Johnston, R. G. Phillips and P. A. Lawrence (1987). "Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene." Cell **50**(4): 659-663.
21. Cao, Y., R. Liu, X. Jiang, J. Lu, J. Jiang, C. Zhang, X. Li and G. Ning (2009). "Nuclear-cytoplasmic shuttling of menin regulates nuclear translocation of {beta}-catenin." Mol Cell Biol **29**(20): 5477-5487.
22. Cases, A. I., T. Ohtsuka, M. Fujino, N. Ideno, S. Kozono, M. Zhao, K. Ohuchida, S. Aishima, M. Nomura, Y. Oda, K. Mizumoto and M. Tanaka (2014). "Expression of glucagon-like Peptide 1 receptor and its effects on biologic behavior in pancreatic neuroendocrine tumors." Pancreas **43**(1): 1-6.
23. Cavallo, R. A., R. T. Cox, M. M. Moline, J. Roose, G. A. Polevoy, H. Clevers, M. Peifer and A. Bejsovec (1998). "Drosophila Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity." Nature **395**(6702): 604-608.
24. Chan, D. W., C. S. Mak, T. H. Leung, K. K. Chan and H. Y. Ngan (2012). "Down-regulation of Sox7 is associated with aberrant activation of Wnt/b-catenin signaling in endometrial cancer." Oncotarget **3**(12): 1546-1556.
25. Chandrasekharappa, S. C., S. C. Guru, P. Manickam, S. E. Olufemi, F. S. Collins, M. R. Emmert-Buck, L. V. Debelenko, Z. Zhuang, I. A. Lubensky, L. A. Liotta, J. S. Crabtree, Y. Wang, B. A. Roe, J. Weisemann, M. S. Boguski, S. K. Agarwal, M. B. Kester, Y. S. Kim, C. Heppner, Q. Dong, A. M. Spiegel, A. L. Burns and S. J. Marx (1997). "Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1." Science **276**(5311): 404-407.
26. Chen, G., J. A. M. Wang, S. Farley, L. Y. Lee, L. C. Lee and M. P. Sawicki (2008). "Menin promotes the Wnt signaling pathway in pancreatic endocrine cells." Mol Cancer Res **6**(12): 1894-1907.
27. Chen, G., J. Fernandez, S. Mische and A. J. Courey (1999). "A functional interaction between the histone deacetylase Rpd3 and the corepressor groucho in Drosophila development." Genes Dev **13**(17): 2218-2230.
28. Chen, L., Z. Zhou and J. Chen (2017). "[Interpretation and evaluation of the American Joint committee on Cancer (AJCC) 8th Edition Staging System for patients with gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors]." Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi **20**(9): 972-976.
29. Chiang, H. C., T. M. O'Dorisio, S. C. Huang, P. N. Maton, J. D. Gardner and R. T. Jensen (1990). "Multiple hormone elevations in Zollinger-Ellison syndrome. Prospective study of clinical significance and of the development of a second symptomatic pancreatic endocrine tumor syndrome." Gastroenterology **99**(6): 1565-1575.

30. Chocarro-Calvo, A., J. M. Garcia-Martinez, S. Ardila-Gonzalez, A. De la Vieja and C. Garcia-Jimenez (2013). "Glucose-induced beta-catenin acetylation enhances Wnt signaling in cancer." Mol Cell **49**(3): 474-486.
31. Christ, E., D. Wild, F. Forrer, M. Brandle, R. Sahli, T. Clerici, B. Gloor, F. Martius, H. Maecke and J. C. Reubi (2009). "Glucagon-like peptide-1 receptor imaging for localization of insulinomas." J Clin Endocrinol Metab **94**(11): 4398-4405.
32. Cryer, P. E., L. Axelrod, A. B. Grossman, S. R. Heller, V. M. Montori, E. R. Seaquist and F. J. Service (2009). "Evaluation and management of adult hypoglycemic disorders: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline." J Clin Endocrinol Metab **94**(3): 709-728.
33. Cryer, P. E., L. Axelrod, A. B. Grossman, S. R. Heller, E. R. Seaquist and F. J. Service (2013). "Diagnostic accuracy of an "amended" insulin-glucose ratio for the biochemical diagnosis of insulinomas." Ann Intern Med **158**(6): 500-501.
34. Daniels, D. L. and W. I. Weis (2005). "Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation." Nat Struct Mol Biol **12**(4): 364-371.
35. De, A. (2011). "Wnt/Ca²⁺ signaling pathway: a brief overview." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **43**(10): 745-756.
36. de Herder, W. W. (2004). "Insulinoma." Neuroendocrinology **80 Suppl 1**: 20-22.
37. de Herder, W. W., B. Niederle, J. Y. Scoazec, S. Pauwels, G. Kloppel, M. Falconi, D. J. Kwekkeboom, K. Oberg, B. Eriksson, B. Wiedenmann, G. Rindi, D. O'Toole and D. Ferone (2006). "Well-differentiated pancreatic tumor/carcinoma: insulinoma." Neuroendocrinology **84**(3): 183-188.
38. De Menna, M., V. D'Amato, A. Ferraro, A. Fusco, R. Di Lauro, C. Garbi and G. De Vita (2013). "Wnt4 inhibits cell motility induced by oncogenic Ras." Oncogene **32**(35): 4110-4119.
39. Del Sindaco, P., G. Casucci, S. Pampanelli, K. Polonsky, C. Fanelli, E. Torlone, F. Santeusano, P. Brunetti and G. B. Bolli (1997). "Late post-prandial hypoglycaemia as the sole presenting feature of secreting pancreatic beta-cell adenoma in a subtotally gastrectomized patient." Eur J Endocrinol **136**(1): 96-99.
40. Dominguez, I., K. Itoh and S. Y. Sokol (1995). "Role of glycogen synthase kinase 3 beta as a negative regulator of dorsoventral axis formation in *Xenopus* embryos." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(18): 8498-8502.

41. Dudczak, R. and T. Traub-Weidinger (2010). "PET and PET/CT in endocrine tumours." Eur J Radiol **73**(3): 481-493.
42. Ekeblad, S., B. Skogseid, K. Dunder, K. Oberg and B. Eriksson (2008). "Prognostic factors and survival in 324 patients with pancreatic endocrine tumor treated at a single institution." Clin Cancer Res **14**(23): 7798-7803.
43. Eriksson, B., K. Oberg and M. Stridsberg (2000). "Tumor markers in neuroendocrine tumors." Digestion **62 Suppl 1**: 33-38.
44. Fajans, S. S. and A. I. Vinik (1989). "Insulin-producing islet cell tumors." Endocrinol Metab Clin North Am **18**(1): 45-74.
45. Falconi, M., D. K. Bartsch, B. Eriksson, G. Kloppel, J. M. Lopes, J. M. O'Connor, R. Salazar, B. G. Taal, M. P. Vullierme, D. O'Toole and p. Barcelona Consensus Conference (2012). "ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine neoplasms of the digestive system: well-differentiated pancreatic non-functioning tumors." Neuroendocrinology **95**(2): 120-134.
46. Falconi, M., B. Eriksson, G. Kaltsas, D. K. Bartsch, J. Capdevila, M. Caplin, B. Kos-Kudla, D. Kwekkeboom, G. Rindi, G. Kloppel, N. Reed, R. Kianmanesh and R. T. Jensen (2016). "ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Patients with Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors and Non-Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors." Neuroendocrinology **103**(2): 153-171.
47. Falconi, M., U. Plockinger, D. J. Kwekkeboom, R. Manfredi, M. Korner, L. Kvols, U. F. Pape, J. Ricke, P. E. Goretzki, S. Wildi, T. Steinmuller, K. Oberg and J. Y. Scoazec (2006). "Well-differentiated pancreatic nonfunctioning tumors/carcinoma." Neuroendocrinology **84**(3): 196-211.
48. Fendrich, V., J. Waldmann, D. K. Bartsch and P. Langer (2009). "Surgical management of pancreatic endocrine tumors." Nat Rev Clin Oncol **6**(7): 419-428.
49. Fernandez-Cruz, L., L. Blanco, R. Cosa and H. Rendon (2008). "Is laparoscopic resection adequate in patients with neuroendocrine pancreatic tumors?" World J Surg **32**(5): 904-917.
50. Fischer, L., J. Kleeff, I. Esposito, U. Hinz, A. Zimmermann, H. Friess and M. W. Buchler (2008). "Clinical outcome and long-term survival in 118 consecutive patients with neuroendocrine tumours of the pancreas." Br J Surg **95**(5): 627-635.
51. Franko, J., W. Feng, L. Yip, E. Genovese and A. J. Moser (2010). "Non-functional neuroendocrine carcinoma of the pancreas: incidence, tumor biology, and outcomes in 2,158 patients." J Gastrointest Surg **14**(3): 541-548.

52. Fujino, T., H. Asaba, M. J. Kang, Y. Ikeda, H. Sone, S. Takada, D. H. Kim, R. X. Ioka, M. Ono, H. Tomoyori, M. Okubo, T. Murase, A. Kamataki, J. Yamamoto, K. Magoori, S. Takahashi, Y. Miyamoto, H. Oishi, M. Nose, M. Okazaki, S. Usui, K. Imaizumi, M. Yanagisawa, J. Sakai and T. T. Yamamoto (2003). "Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(1): 229-234.
53. Garcia-Castro, B., M. Alvarez-Zavala, A. R. Riveros-Magana, P. C. Ortiz-Lazareno, S. Ratkovich-Gonzalez, G. Hernandez-Flores, A. Bravo-Cuellar, L. F. Jave-Suarez and A. Aguilar-Lemarroy (2013). "Restoration of WNT4 inhibits cell growth in leukemia-derived cell lines." BMC Cancer **13**: 557.
54. Gibril, F. and R. T. Jensen (2004). "Diagnostic uses of radiolabelled somatostatin receptor analogues in gastroenteropancreatic endocrine tumours." Dig Liver Dis **36 Suppl 1**: S106-120.
55. Goode, P. N., J. R. Farndon, J. Anderson, I. D. Johnston and J. A. Morte (1986). "Diazoxide in the management of patients with insulinoma." World J Surg **10**(4): 586-592.
56. Gordon, M. D. and R. Nusse (2006). "Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors." J Biol Chem **281**(32): 22429-22433.
57. Gortz, B., J. Roth, A. Krahenmann, R. R. de Krijger, S. Muletta-Feurer, K. Rutimann, P. Saremaslani, E. J. Speel, P. U. Heitz and P. Komminoth (1999). "Mutations and allelic deletions of the MEN1 gene are associated with a subset of sporadic endocrine pancreatic and neuroendocrine tumors and not restricted to foregut neoplasms." Am J Pathol **154**(2): 429-436.
58. Grama, D., B. Eriksson, H. Martensson, B. Cedermark, B. Ahren, A. Kristoffersson, J. Rastad, K. Oberg and G. Akerstrom (1992). "Clinical characteristics, treatment and survival in patients with pancreatic tumors causing hormonal syndromes." World J Surg **16**(4): 632-639.
59. Grant, C. S. (2005). "Insulinoma." Best Pract Res Clin Gastroenterol **19**(5): 783-798.
60. Guettier, J. M. and P. Gorden (2010). "Insulin secretion and insulin-producing tumors." Expert Rev Endocrinol Metab **5**(2): 217-227.
61. Guettier, J. M., A. Kam, R. Chang, M. C. Skarulis, C. Cochran, H. R. Alexander, S. K. Libutti, J. F. Pingpank and P. Gorden (2009). "Localization of insulinomas to regions of the pancreas by intraarterial calcium stimulation: the NIH experience." J Clin Endocrinol Metab **94**(4): 1074-1080.

62. Guettier, J. M., A. Lungu, A. Goodling, C. Cochran and P. Gorden (2013). "The role of proinsulin and insulin in the diagnosis of insulinoma: a critical evaluation of the Endocrine Society clinical practice guideline." J Clin Endocrinol Metab **98**(12): 4752-4758.
63. Halfdanarson, T. R., K. G. Rabe, J. Rubin and G. M. Petersen (2008). "Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): incidence, prognosis and recent trend toward improved survival." Ann Oncol **19**(10): 1727-1733.
64. He, S., Y. Lu, X. Liu, X. Huang, E. T. Keller, C. N. Qian and J. Zhang (2015). "Wnt3a: functions and implications in cancer." Chin J Cancer **34**(12): 554-562.
65. Heitz, P. U., P. Komminoth, A. Perren and e. al. (2004). "Pancreatic endocrine tumours." DeLellis R, Lloyd R, Heitz PU, et al, eds. World Health Organization classification of tumors pathology and genetics of tumors of endocrine organs. Lyon. France: IARC Press: 177-182.
66. Heller, C., M. C. Kuhn, B. Mulders-Opgenoorth, M. Schott, H. S. Willenberg, W. A. Scherbaum and S. Schinner (2011). "Exendin-4 upregulates the expression of Wnt-4, a novel regulator of pancreatic beta-cell proliferation." Am J Physiol Endocrinol Metab **301**(5): E864-872.
67. Heller, R. S., D. S. Dichmann, J. Jensen, C. Miller, G. Wong, O. D. Madsen and P. Serup (2002). "Expression patterns of Wnts, Frizzleds, sFRPs, and misexpression in transgenic mice suggesting a role for Wnts in pancreas and foregut pattern formation." Dev Dyn **225**(3): 260-270.
68. Heller, R. S., T. Klein, Z. Ling, H. Heimberg, M. Katoh, O. D. Madsen and P. Serup (2003). "Expression of Wnt, Frizzled, sFRP, and DKK genes in adult human pancreas." Gene Expr **11**(3-4): 141-147.
69. Hirshberg, B., A. Livi, D. L. Bartlett, S. K. Libutti, H. R. Alexander, J. L. Doppman, M. C. Skarulis and P. Gorden (2000). "Forty-eight-hour fast: the diagnostic test for insulinoma." J Clin Endocrinol Metab **85**(9): 3222-3226.
70. Holcombe, R. F., J. L. Marsh, M. L. Waterman, F. Lin, T. Milovanovic and T. Truong (2002). "Expression of Wnt ligands and Frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma." Mol Pathol **55**(4): 220-226.
71. Iida, K., T. Ohara, Y. Hino, M. Nobuhara, J. Ishida and K. Chihara (2010). "Glucose-responsive insulinoma in a patient with postprandial hypoglycemia in the morning." Intern Med **49**(19): 2123-2127.
72. Isla, A., J. D. Arbuckle, P. B. Kekis, A. Lim, J. E. Jackson, J. F. Todd and J. Lynn (2009). "Laparoscopic management of insulinomas." Br J Surg **96**(2): 185-190.

73. Jensen, R. T., M. J. Berna, D. B. Bingham and J. A. Norton (2008). "Inherited pancreatic endocrine tumor syndromes: advances in molecular pathogenesis, diagnosis, management, and controversies." Cancer **113**(7 Suppl): 1807-1843.
74. Jensen, R. T., G. Cadiot, M. L. Brandi, W. W. de Herder, G. Kaltsas, P. Komminoth, J. Y. Scoazec, R. Salazar, A. Sauvanet, R. Kianmanesh and p. Barcelona Consensus Conference (2012). "ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine neoplasms: functional pancreatic endocrine tumor syndromes." Neuroendocrinology **95**(2): 98-119.
75. Jiao, Y., C. Shi, B. H. Edil, R. F. de Wilde, D. S. Klimstra, A. Maitra, R. D. Schulick, L. H. Tang, C. L. Wolfgang, M. A. Choti, V. E. Velculescu, L. A. Diaz, Jr., B. Vogelstein, K. W. Kinzler, R. H. Hruban and N. Papadopoulos (2011). "DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors." Science **331**(6021): 1199-1203.
76. Jin, T. (2008). "The WNT signalling pathway and diabetes mellitus." Diabetologia **51**(10): 1771-1780.
77. Kaltsas, G. A., G. M. Besser and A. B. Grossman (2004). "The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors." Endocr Rev **25**(3): 458-511.
78. Kapoor, R. R., C. James and K. Hussain (2009). "Hyperinsulinism in developmental syndromes." Endocr Dev **14**: 95-113.
79. Katoh, M. and M. Katoh (2005). "Comparative genomics on Wnt8a and Wnt8b genes." Int J Oncol **26**(4): 1129-1133.
80. Kauhanen, S., M. Seppanen, H. Minn and P. Nuutila (2010). "Clinical PET imaging of insulinoma and beta-cell hyperplasia." Curr Pharm Des **16**(14): 1550-1560.
81. Kaur, N., S. Chettiar, S. Rathod, P. Rath, D. Muzumdar, M. L. Shaikh and A. Shiras (2013). "Wnt3a mediated activation of Wnt/beta-catenin signaling promotes tumor progression in glioblastoma." Mol Cell Neurosci **54**: 44-57.
82. Kim, J. Y., S. M. Hong and J. Y. Ro (2017). "Recent updates on grading and classification of neuroendocrine tumors." Ann Diagn Pathol **29**: 11-16.
83. Kirikoshi, H., H. Sekihara and M. Katoh (2001). "Up-regulation of Frizzled-7 (FZD7) in human gastric cancer." Int J Oncol **19**(1): 111-115.
84. Klimstra, D. S., I. R. Modlin, D. Coppola, R. V. Lloyd and S. Suster (2010). "The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review

- of nomenclature, grading, and staging systems." Pancreas **39**(6): 707-712.
85. Kloppel, G. (2007). "Tumour biology and histopathology of neuroendocrine tumours." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **21**(1): 15-31.
86. Kloppel, G. (2011). "Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms." Endocr Relat Cancer **18 Suppl 1**: S1-16.
87. Kloppel, G., M. Anlauf and A. Perren (2007). "Endocrine precursor lesions of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors." Endocr Pathol **18**(3): 150-155.
88. Kloppel, G., A. Perren and P. U. Heitz (2004). "The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification." Ann N Y Acad Sci **1014**: 13-27.
89. Kloppel, G., A. Reinecke-Luthge and F. Koschoreck (1999). "Focal and Diffuse Beta Cell Changes in Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy." Endocr Pathol **10**(4): 299-304.
90. Kloppel, G., G. Rindi, A. Perren, P. Komminoth and D. S. Klimstra (2010). "The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: a statement." Virchows Arch **456**(6): 595-597.
91. Kononen, J., L. Bubendorf, A. Kallioniemi, M. Barlund, P. Schraml, S. Leighton, J. Torhorst, M. J. Mihatsch, G. Sauter and O. P. Kallioniemi (1998). "Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens." Nat Med **4**(7): 844-847.
92. Krutzfeldt, J. and M. Stoffel (2010). "Regulation of wingless-type MMTV integration site family (WNT) signalling in pancreatic islets from wild-type and obese mice." Diabetologia **53**(1): 123-127.
93. Kulke, M. H., L. B. Anthony, D. L. Bushnell, W. W. de Herder, S. J. Goldsmith, D. S. Klimstra, S. J. Marx, J. L. Pasiaka, R. F. Pommier, J. C. Yao, R. T. Jensen and S. North American Neuroendocrine Tumor (2010). "NANETS treatment guidelines: well-differentiated neuroendocrine tumors of the stomach and pancreas." Pancreas **39**(6): 735-752.
94. Kulke, M. H., E. K. Bergsland and J. C. Yao (2009). "Glycemic control in patients with insulinoma treated with everolimus." N Engl J Med **360**(2): 195-197.
95. Kwekkeboom, D. J., E. P. Krenning, K. Scheidhauer, V. Lewington, R. Lebtahi, A. Grossman, P. Vitek, A. Sundin, U. Plockinger, p. Mallorca Consensus Conference and S. European Neuroendocrine Tumor (2009).

- "ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: somatostatin receptor imaging with (111)In-pentetreotide." Neuroendocrinology **90**(2): 184-189.
96. La Rosa, S., C. Klersy, S. Uccella, L. Dainese, L. Albarello, A. Sonzogni, C. Doglioni, C. Capella and E. Solcia (2009). "Improved histologic and clinicopathologic criteria for prognostic evaluation of pancreatic endocrine tumors." Hum Pathol **40**(1): 30-40.
97. Lemmens, I., W. J. Van de Ven, K. Kas, C. X. Zhang, S. Giraud, V. Wautot, N. Buisson, K. De Witte, J. Salandre, G. Lenoir, M. Pugeat, A. Calender, F. Parente, D. Quincey, P. Gaudray, M. J. De Wit, C. J. Lips, J. W. Hoppener, S. Khodaei, A. L. Grant, G. Weber, S. Kytola, B. T. Teh, F. Farnebo, R. V. Thakker and et al. (1997). "Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. The European Consortium on MEN1." Hum Mol Genet **6**(7): 1177-1183.
98. Li, Q., X. Wang, X. Wu, Y. Rui, W. Liu, J. Wang, X. Wang, Y. C. Liou, Z. Ye and S. C. Lin (2007). "Daxx cooperates with the Axin/HIPK2/p53 complex to induce cell death." Cancer Res **67**(1): 66-74.
99. Li, W., Y. Zhang, M. Zhang, G. Huang and Q. Zhang (2014). "Wnt4 is overexpressed in human pituitary adenomas and is associated with tumor invasion." J Clin Neurosci **21**(1): 137-141.
100. Liu, Z. and J. F. Habener (2008). "Glucagon-like peptide-1 activation of TCF7L2-dependent Wnt signaling enhances pancreatic beta cell proliferation." J Biol Chem **283**(13): 8723-8735.
101. Lloyd, R. V., R. Y. Osamura, G. Klöppel and J. Rosai (2017). "WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs." Lyon: IARC Press.
102. Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 781-810.
103. Lu, D., Y. Zhao, R. Tawatao, H. B. Cottam, M. Sen, L. M. Leoni, T. J. Kipps, M. Corr and D. A. Carson (2004). "Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(9): 3118-3123.
104. Marsk, R., E. Jonas, F. Rasmussen and E. Naslund (2010). "Nationwide cohort study of post-gastric bypass hypoglycaemia including 5,040 patients undergoing surgery for obesity in 1986-2006 in Sweden." Diabetologia **53**(11): 2307-2311.
105. Mathur, A., P. Gorden and S. K. Libutti (2009). "Insulinoma." Surg Clin North Am **89**(5): 1105-1121.

106. McMahon, A. P. and R. T. Moon (1989). "Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis." Cell **58**(6): 1075-1084.
107. Memarian, A., M. Hojjat-Farsangi, H. Asgarian-Omran, V. Younesi, M. Jeddi-Tehrani, R. A. Sharifian, J. Khoshnoodi, S. M. Razavi, H. Rabbani and F. Shokri (2009). "Variation in WNT genes expression in different subtypes of chronic lymphocytic leukemia." Leuk Lymphoma **50**(12): 2061-2070.
108. Memarian, A., P. Vosough, H. Asgarian-Omran, M. Tabrizi, M. Shabani and F. Shokri (2012). "Differential WNT gene expression in various subtypes of acute lymphoblastic leukemia." Iran J Immunol **9**(1): 61-71.
109. Merle, P., S. de la Monte, M. Kim, M. Herrmann, S. Tanaka, A. Von Dem Bussche, M. C. Kew, C. Trepo and J. R. Wands (2004). "Functional consequences of frizzled-7 receptor overexpression in human hepatocellular carcinoma." Gastroenterology **127**(4): 1110-1122.
110. Metz, D. C. and R. T. Jensen (2008). "Gastrointestinal neuroendocrine tumors: pancreatic endocrine tumors." Gastroenterology **135**(5): 1469-1492.
111. Mignon, M. (2000). "Natural history of neuroendocrine enteropancreatic tumors." Digestion **62 Suppl 1**: 51-58.
112. Miyakoshi, T., M. Takei, H. Kajiya, N. Egashira, S. Takekoshi, A. Teramoto and R. Y. Osamura (2008). "Expression of Wnt4 in human pituitary adenomas regulates activation of the beta-catenin-independent pathway." Endocr Pathol **19**(4): 261-273.
113. Modlin, I. M., K. D. Lye and M. Kidd (2003). "A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors." Cancer **97**(4): 934-959.
114. Morganstein, D. L., D. H. Lewis, J. Jackson, A. Isla, J. Lynn, D. Devendra, K. Meeran and J. F. Todd (2009). "The role of arterial stimulation and simultaneous venous sampling in addition to cross-sectional imaging for localisation of biochemically proven insulinoma." Eur Radiol **19**(10): 2467-2473.
115. Murtaugh, L. C., A. C. Law, Y. Dor and D. A. Melton (2005). "Beta-catenin is essential for pancreatic acinar but not islet development." Development **132**(21): 4663-4674.
116. Nauck, M. A. and J. J. Meier (2012). "Diagnostic accuracy of an "amended" insulin-glucose ratio for the biochemical diagnosis of insulinomas." Ann Intern Med **157**(11): 767-775.
117. Nikfarjam, M., A. L. Warshaw, L. Axelrod, V. Deshpande, S. P. Thayer, C. R. Ferrone and C. Fernandez-del Castillo (2008). "Improved

- contemporary surgical management of insulinomas: a 25-year experience at the Massachusetts General Hospital." Ann Surg **247**(1): 165-172.
118. Nobels, F. R., D. J. Kwekkeboom, W. Coopmans, C. H. Schoenmakers, J. Lindemans, W. W. De Herder, E. P. Krenning, R. Bouillon and S. W. Lamberts (1997). "Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the alpha-subunit of glycoprotein hormones." J Clin Endocrinol Metab **82**(8): 2622-2628.
119. Noone, T. C., J. Hosey, Z. Firat and R. C. Semelka (2005). "Imaging and localization of islet-cell tumours of the pancreas on CT and MRI." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **19**(2): 195-211.
120. Noordermeer, J., J. Klingensmith, N. Perrimon and R. Nusse (1994). "dishevelled and armadillo act in the wingless signalling pathway in Drosophila." Nature **367**(6458): 80-83.
121. Norton, J. A., T. D. Fang and R. T. Jensen (2006). "Surgery for gastrinoma and insulinoma in multiple endocrine neoplasia type 1." J Natl Compr Canc Netw **4**(2): 148-153.
122. Nusse, R. and H. E. Varmus (1982). "Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome." Cell **31**(1): 99-109.
123. Oberg, K. (2010). "Pancreatic endocrine tumors." Semin Oncol **37**(6): 594-618.
124. Oberg, K. and B. Eriksson (2005). "Endocrine tumours of the pancreas." Best Pract Res Clin Gastroenterol **19**(5): 753-781.
125. Oberndorfer, S. (1907). "Karzinoide Tumoren des Dünndarms." Frankf. Z. Pathol. **1**: 426-432.
126. Ong, G. S., D. E. Henley, D. Hurley, J. H. Turner, P. G. Claringbold and P. G. Fegan (2010). "Therapies for the medical management of persistent hypoglycaemia in two cases of inoperable malignant insulinoma." Eur J Endocrinol **162**(5): 1001-1008.
127. Ouyang, D., D. Dhall and R. Yu (2011). "Pathologic pancreatic endocrine cell hyperplasia." World J Gastroenterol **17**(2): 137-143.
128. Pan, L., M. Yao, W. Zheng, J. Gu, X. Yang, L. Qiu, Y. Cai, W. Wu and D. Yao (2016). "Abnormality of Wnt3a expression as novel specific biomarker for diagnosis and differentiation of hepatocellular carcinoma." Tumour Biol **37**(4): 5561-5568.

129. Papadopoulou, S. and H. Edlund (2005). "Attenuated Wnt signaling perturbs pancreatic growth but not pancreatic function." Diabetes **54**(10): 2844-2851.
130. Pape, U. F., H. Jann, J. Muller-Nordhorn, A. Bockelbrink, U. Berndt, S. N. Willich, M. Koch, C. Rocken, G. Rindi and B. Wiedenmann (2008). "Prognostic relevance of a novel TNM classification system for upper gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors." Cancer **113**(2): 256-265.
131. Pasca di Magliano, M., A. V. Biankin, P. W. Heiser, D. A. Cano, P. J. Gutierrez, T. Deramaudt, D. Segara, A. C. Dawson, J. G. Kench, S. M. Henshall, R. L. Sutherland, A. Dlugosz, A. K. Rustgi and M. Hebrok (2007). "Common activation of canonical Wnt signaling in pancreatic adenocarcinoma." PLoS One **2**(11): e1155.
132. Patel, K. K. and M. K. Kim (2008). "Neuroendocrine tumors of the pancreas: endoscopic diagnosis." Curr Opin Gastroenterol **24**(5): 638-642.
133. Patti, M. E., G. McMahon, E. C. Mun, A. Bitton, J. J. Holst, J. Goldsmith, D. W. Hanto, M. Callery, R. Arky, V. Nose, S. Bonner-Weir and A. B. Goldfine (2005). "Severe hypoglycaemia post-gastric bypass requiring partial pancreatectomy: evidence for inappropriate insulin secretion and pancreatic islet hyperplasia." Diabetologia **48**(11): 2236-2240.
134. Peifer, M., C. Rauskolb, M. Williams, B. Riggelman and E. Wieschaus (1991). "The segment polarity gene armadillo interacts with the wingless signaling pathway in both embryonic and adult pattern formation." Development **111**(4): 1029-1043.
135. Perren, A., A. Schmitt, P. Komminoth and M. Pavel (2009). "Classification of gastro-entero-pancreatic neuroendocrine tumors." Radiologe **49**(3): 198-205.
136. Polakis, P. (2000). "Wnt signaling and cancer." Genes Dev **14**(15): 1837-1851.
137. Qi, L., B. Sun, Z. Liu, R. Cheng, Y. Li and X. Zhao (2014). "Wnt3a expression is associated with epithelial-mesenchymal transition and promotes colon cancer progression." J Exp Clin Cancer Res **33**: 107.
138. Quinkler, M., F. Strelow, M. Pirlich, W. Rohde, H. Biering, H. Lochs, H. Gerl, C. J. Strasburger and M. Ventz (2007). "Assessment of suspected insulinoma by 48-hour fasting test: a retrospective monocentric study of 23 cases." Horm Metab Res **39**(7): 507-510.
139. Raffel, A., M. Krausch, K. Roushan, M. Anlauf, T. Henopp, D. Hafner, N. Lehwald, F. Kropil, M. Schott, C. F. Eisenberger, W. T. Knoefel and N. H.

- Stoecklein (2011). "Global histone modification pattern predicts poor prognosis in organic hyperinsulinism." Horm Metab Res **43**(12): 858-864.
140. Rahier, J., Y. Guiot and C. Sempoux (2000). "Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy: a heterogeneous syndrome unrelated to nesidioblastosis." Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed **82**(2): F108-112.
141. Remmele, W. and H. E. Stegner (1987). "[Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]." Pathologe **8**(3): 138-140.
142. Rijsewijk, F., M. Schuermann, E. Wagenaar, P. Parren, D. Weigel and R. Nusse (1987). "The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless." Cell **50**(4): 649-657.
143. Rindi, G., R. Arnold, F. Bosman, C. Capella, D. Klimstra, G. Kloppel, P. Komminoth and E. Solcia (2010). "Nomenclature and classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system. ." Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise N eds. WHO Classification of Tumours of the Digestive System, Lyon: IARC Press.: pp 13–14.
144. Rindi, G. and C. Bordi (2005). "Endocrine tumours of the gastrointestinal tract: aetiology, molecular pathogenesis and genetics." Best Pract Res Clin Gastroenterol **19**(4): 519-534.
145. Rindi, G. and G. Kloppel (2004). "Endocrine tumors of the gut and pancreas tumor biology and classification." Neuroendocrinology **80** Suppl 1: 12-15.
146. Rindi, G., G. Kloppel, H. Alhman, M. Caplin, A. Couvelard, W. W. de Herder, B. Eriksson, A. Falchetti, M. Falconi, P. Komminoth, M. Korner, J. M. Lopes, A. M. McNicol, O. Nilsson, A. Perren, A. Scarpa, J. Y. Scoazec and B. Wiedenmann (2006). "TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system." Virchows Arch **449**(4): 395-401.
147. Rindi, G., G. Kloppel, A. Couvelard, P. Komminoth, M. Korner, J. M. Lopes, A. M. McNicol, O. Nilsson, A. Perren, A. Scarpa, J. Y. Scoazec and B. Wiedenmann (2007). "TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system." Virchows Arch **451**(4): 757-762.
148. Rindi, G., V. Villanacci, A. Ubiali and A. Scarpa (2001). "Endocrine tumors of the digestive tract and pancreas: histogenesis, diagnosis and molecular basis." Expert Rev Mol Diagn **1**(3): 323-333.

149. Rockall, A. G. and R. H. Reznek (2007). "Imaging of neuroendocrine tumours (CT/MR/US)." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **21**(1): 43-68.
150. Rulifson, I. C., S. K. Karnik, P. W. Heiser, D. ten Berge, H. Chen, X. Gu, M. M. Taketo, R. Nusse, M. Hebrok and S. K. Kim (2007). "Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(15): 6247-6252.
151. Salazar, R., B. Wiedenmann, G. Rindi and P. Ruzsniwski (2012). "ENETS 2011 Consensus Guidelines for the Management of Patients with Digestive Neuroendocrine Tumors: an update." Neuroendocrinology **95**(2): 71-73.
152. Sandberg, C. J., G. Altschuler, J. Jeong, K. K. Stromme, B. Stangeland, W. Murrell, U. H. Grasmø-Wendler, O. Myklebost, E. Helseth, E. O. Vik-Mo, W. Hide and I. A. Langmoen (2013). "Comparison of glioma stem cells to neural stem cells from the adult human brain identifies dysregulated Wnt- signaling and a fingerprint associated with clinical outcome." Exp Cell Res **319**(14): 2230-2243.
153. Scarpa, A., W. Mantovani, P. Capelli, S. Beghelli, L. Boninsegna, R. Bettini, F. Panzuto, P. Pederzoli, G. delle Fave and M. Falconi (2010). "Pancreatic endocrine tumors: improved TNM staging and histopathological grading permit a clinically efficient prognostic stratification of patients." Mod Pathol **23**(6): 824-833.
154. Schinner, S. (2009). "Wnt-signalling and the metabolic syndrome." Horm Metab Res **41**(2): 159-163.
155. Schinner, S., F. Ulgen, C. Papewalis, M. Schott, A. Woelk, A. Vidal-Puig and W. A. Scherbaum (2008). "Regulation of insulin secretion, glucokinase gene transcription and beta cell proliferation by adipocyte-derived Wnt signalling molecules." Diabetologia **51**(1): 147-154.
156. Schinner, S., H. S. Willenberg, M. Schott and W. A. Scherbaum (2009). "Pathophysiological aspects of Wnt-signaling in endocrine disease." Eur J Endocrinol **160**(5): 731-737.
157. Schmuck, R., V. Warneke, H. M. Behrens, E. Simon, W. Weichert and C. Rocken (2011). "Genotypic and phenotypic characterization of side population of gastric cancer cell lines." Am J Pathol **178**(4): 1792-1804.
158. Service, F. J. (1995). "Hypoglycemic disorders." N Engl J Med **332**(17): 1144-1152.
159. Service, F. J. (1997). "Insulinoma and other islet-cell tumors." Cancer Treat Res **89**: 335-346.

160. Service, F. J., A. J. Dale, L. R. Elveback and N. S. Jiang (1976). "Insulinoma: clinical and diagnostic features of 60 consecutive cases." Mayo Clin Proc **51**(7): 417-429.
161. Service, F. J., M. M. McMahon, P. C. O'Brien and D. J. Ballard (1991). "Functioning insulinoma--incidence, recurrence, and long-term survival of patients: a 60-year study." Mayo Clin Proc **66**(7): 711-719.
162. Service, F. J., N. Natt, G. B. Thompson, C. S. Grant, J. A. van Heerden, J. C. Andrews, E. Lorenz, A. Terzic and R. V. Lloyd (1999). "Noninsulinoma pancreatogenous hypoglycemia: a novel syndrome of hyperinsulinemic hypoglycemia in adults independent of mutations in Kir6.2 and SUR1 genes." J Clin Endocrinol Metab **84**(5): 1582-1589.
163. Service, G. J., G. B. Thompson, F. J. Service, J. C. Andrews, M. L. Collazo-Clavell and R. V. Lloyd (2005). "Hyperinsulinemic hypoglycemia with nesidioblastosis after gastric-bypass surgery." N Engl J Med **353**(3): 249-254.
164. Sharma, P., S. Arora, V. S. Dhull, N. Naswa, R. Kumar, A. C. Ammini and C. Bal (2015). "Evaluation of (68)Ga-DOTANOC PET/CT imaging in a large exclusive population of pancreatic neuroendocrine tumors." Abdom Imaging **40**(2): 299-309.
165. Sharma, P., S. Arora, S. Karunanithi, R. Khadgawat, P. Durgapal, R. Sharma, D. Kandasamy, C. Bal and R. Kumar (2016). "Somatostatin receptor based PET/CT imaging with 68Ga-DOTA-Nal3-octreotide for localization of clinically and biochemically suspected insulinoma." Q J Nucl Med Mol Imaging **60**(1): 69-76.
166. Sharma, R. P. and V. L. Chopra (1976). "Effect of the Wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*." Dev Biol **48**(2): 461-465.
167. Shimizu, H., M. A. Julius, M. Giarre, Z. Zheng, A. M. Brown and J. Kitajewski (1997). "Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin." Cell Growth Differ **8**(12): 1349-1358.
168. Shu, L., N. S. Sauter, F. T. Schulthess, A. V. Matveyenko, J. Oberholzer and K. Maedler (2008). "Transcription factor 7-like 2 regulates beta-cell survival and function in human pancreatic islets." Diabetes **57**(3): 645-653.
169. Siegfried, E., E. L. Wilder and N. Perrimon (1994). "Components of wingless signalling in *Drosophila*." Nature **367**(6458): 76-80.
170. Sobin, L., M. Gospodarowicz and C. Wittekind (2009). "UICC:TNM classification of malignant tumours." 7th edn. Oxford, UK: Wiley-Blackwell.

171. Sokol, S. Y., J. Klingensmith, N. Perrimon and K. Itoh (1995). "Dorsalizing and neuralizing properties of Xdsh, a maternally expressed *Xenopus* homolog of dishevelled." Development **121**(10): 3487.
172. Solcia, E., G. Kloppel and L. Sobin (2000). "Histological typing of endocrine tumours." WHO International Histological Classification of Tumours, 2nd Edn. Berlin, Germany: Springer.
173. Sowa-Staszczak, A., D. Pach, R. Mikolajczak, H. Macke, A. Jabrocka-Hybel, A. Stefanska, M. Tomaszuk, B. Janota, A. Gilis-Januszewska, M. Malecki, G. Kaminski, A. Kowalska, J. Kulig, A. Matyja, C. Osuch and A. Hubalewska-Dydejczyk (2013). "Glucagon-like peptide-1 receptor imaging with [Lys40(Ahx-HYNIC- 99mTc/EDDA)NH2]-exendin-4 for the detection of insulinoma." Eur J Nucl Med Mol Imaging **40**(4): 524-531.
174. Stefanini, P., M. Carboni, N. Patrassi and A. Basoli (1974). "Beta-islet cell tumors of the pancreas: results of a study on 1,067 cases." Surgery **75**(4): 597-609.
175. Stridsberg, M., B. Eriksson, K. Oberg and E. T. Janson (2005). "A panel of 13 region-specific radioimmunoassays for measurements of human chromogranin B." Regul Pept **125**(1-3): 193-199.
176. Su, A. P., N. W. Ke, Y. Zhang, X. B. Liu, W. M. Hu, B. L. Tian and Z. D. Zhang (2014). "Is laparoscopic approach for pancreatic insulinomas safe? Results of a systematic review and meta-analysis." J Surg Res **186**(1): 126-134.
177. Sundin, A., U. Garske and H. Orlefors (2007). "Nuclear imaging of neuroendocrine tumours." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **21**(1): 69-85.
178. Sussman, D. J., J. Klingensmith, P. Salinas, P. S. Adams, R. Nusse and N. Perrimon (1994). "Isolation and characterization of a mouse homolog of the *Drosophila* segment polarity gene dishevelled." Dev Biol **166**(1): 73-86.
179. Takei, Y., M. Takigahira, K. Mihara, Y. Tarumi and K. Yanagihara (2011). "The metastasis-associated microRNA miR-516a-3p is a novel therapeutic target for inhibiting peritoneal dissemination of human scirrhous gastric cancer." Cancer Res **71**(4): 1442-1453.
180. Taki, M., N. Kamata, K. Yokoyama, R. Fujimoto, S. Tsutsumi and M. Nagayama (2003). "Down-regulation of Wnt-4 and up-regulation of Wnt-5a expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells." Cancer Sci **94**(7): 593-597.
181. Tamai, K., M. Semenov, Y. Kato, R. Spokony, C. Liu, Y. Katsuyama, F. Hess, J. P. Saint-Jeannet and X. He (2000). "LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction." Nature **407**(6803): 530-535.

182. Tanaka, S., T. Akiyoshi, M. Mori, J. R. Wands and K. Sugimachi (1998). "A novel frizzled gene identified in human esophageal carcinoma mediates APC/beta-catenin signals." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(17): 10164-10169.
183. Thompson, G. B., F. J. Service, J. C. Andrews, R. V. Lloyd, N. Natt, J. A. van Heerden and C. S. Grant (2000). "Noninsulinoma pancreatogenous hypoglycemia syndrome: an update in 10 surgically treated patients." Surgery **128**(6): 937-944;discussion 944-935.
184. Tiwary, S. and L. Xu (2016). "FRIZZLED7 Is Required for Tumor Initiation and Metastatic Growth of Melanoma Cells." PLoS One **11**(1): e0147638.
185. To, K. F., M. W. Chan, W. K. Leung, J. Yu, J. H. Tong, T. L. Lee, F. K. Chan and J. J. Sung (2001). "Alterations of frizzled (FzE3) and secreted frizzled related protein (hsFRP) expression in gastric cancer." Life Sci **70**(4): 483-489.
186. Toaiari, M., M. V. Davi, L. Dalle Carbonare, L. Boninsegna, C. Castellani, M. Falconi and G. Francia (2013). "Presentation, diagnostic features and glucose handling in a monocentric series of insulinomas." J Endocrinol Invest **36**(9): 753-758.
187. van Amerongen, R. and R. Nusse (2009). "Towards an integrated view of Wnt signaling in development." Development **136**(19): 3205-3214.
188. van de Wetering, M., R. Cavallo, D. Dooijes, M. van Beest, J. van Es, J. Loureiro, A. Ypma, D. Hursh, T. Jones, A. Bejsovec, M. Peifer, M. Mortin and H. Clevers (1997). "Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF." Cell **88**(6): 789-799.
189. Vanderveen, K. and C. Grant (2010). "Insulinoma." Cancer Treat Res **153**: 235-252.
190. Vezzosi, D., A. Bennet, J. Fauvel, C. Boulanger, O. Tazi, J. P. Louvet and P. Caron (2003). "Insulin levels measured with an insulin-specific assay in patients with fasting hypoglycaemia related to endogenous hyperinsulinism." Eur J Endocrinol **149**(5): 413-419.
191. Vezzosi, D., A. Bennet, J. Fauvel and P. Caron (2007). "Insulin, C-peptide and proinsulin for the biochemical diagnosis of hypoglycaemia related to endogenous hyperinsulinism." Eur J Endocrinol **157**(1): 75-83.
192. Vincan, E. (2004). "Frizzled/WNT signalling: the insidious promoter of tumour growth and progression." Front Biosci **9**: 1023-1034.

193. Vincan, E., P. K. Darcy, C. A. Farrelly, M. C. Faux, T. Brabletz and R. G. Ramsay (2007). "Frizzled-7 dictates three-dimensional organization of colorectal cancer cell carcinoids." Oncogene **26**(16): 2340-2352.
194. Vinik, A. I., E. A. Woltering, R. R. Warner, M. Caplin, T. M. O'Dorisio, G. A. Wiseman, D. Coppola and V. L. Go (2010). "NANETS consensus guidelines for the diagnosis of neuroendocrine tumor." Pancreas **39**(6): 713-734.
195. Virgolini, I., T. Traub-Weidinger and C. Decristoforo (2005). "Nuclear medicine in the detection and management of pancreatic islet-cell tumours." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **19**(2): 213-227.
196. Volkomorov, V., E. Grigoryeva, G. Krasnov, N. Litviakov, M. Tsyganov, M. Karbyshev, M. Zavyalova, C. S. Afanasssmall u, N. Cherdyntseva, N. Lisitsyn and S. Beresten (2013). "Search for potential gastric cancer markers using miRNA databases and gene expression analysis." Exp Oncol **35**(1): 2-7.
197. Vortmeyer, A. O., S. Huang, I. Lubensky and Z. Zhuang (2004). "Non-islet origin of pancreatic islet cell tumors." J Clin Endocrinol Metab **89**(4): 1934-1938.
198. Vouyovitch, C. M., J. K. Perry, D. X. Liu, L. Bezin, E. Vilain, J. J. Diaz, P. E. Lobie and H. C. Mertani (2016). "WNT4 mediates the autocrine effects of growth hormone in mammary carcinoma cells." Endocr Relat Cancer **23**(7): 571-585.
199. Wang, E. H., S. A. Ebrahimi, A. Y. Wu, C. Kashefi, E. Passaro, Jr. and M. P. Sawicki (1998). "Mutation of the MENIN gene in sporadic pancreatic endocrine tumors." Cancer Res **58**(19): 4417-4420.
200. Wang, H. Q., M. L. Xu, J. Ma, Y. Zhang and C. H. Xie (2012). "Frizzled-8 as a putative therapeutic target in human lung cancer." Biochem Biophys Res Commun **417**(1): 62-66.
201. Williams, E. D. and M. Sandler (1963). "The classification of carcinoid tumours" Lancet **1** (7275): 238-239.
202. Won, J. G., H. S. Tseng, A. H. Yang, K. T. Tang, T. S. Jap, C. H. Lee, H. D. Lin, N. Burcus, G. Pittenger and A. Vinik (2006). "Clinical features and morphological characterization of 10 patients with noninsulinoma pancreatogenous hypoglycaemia syndrome (NIPHS)." Clin Endocrinol (Oxf) **65**(5): 566-578.
203. Wong, C. M., S. T. Fan and I. O. Ng (2001). "beta-Catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma: clinicopathologic and prognostic significance." Cancer **92**(1): 136-145.

204. Wong, G. T., B. J. Gavin and A. P. McMahon (1994). "Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes." Mol Cell Biol **14**(9): 6278-6286.
205. Wu, T. and X. Hua (2011). "Menin represses tumorigenesis via repressing cell proliferation." Am J Cancer Res **1**(6): 726-739.
206. Yachida, S., E. Vakiani, C. M. White, Y. Zhong, T. Saunders, R. Morgan, R. F. de Wilde, A. Maitra, J. Hicks, A. M. Demarzo, C. Shi, R. Sharma, D. Laheru, B. H. Edil, C. L. Wolfgang, R. D. Schulick, R. H. Hruban, L. H. Tang, D. S. Klimstra and C. A. Iacobuzio-Donahue (2012). "Small cell and large cell neuroendocrine carcinomas of the pancreas are genetically similar and distinct from well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors." Am J Surg Pathol **36**(2): 173-184.
207. Yan, L., L. Della Coletta, K. L. Powell, J. Shen, H. Thames, C. M. Aldaz and M. C. MacLeod (2011). "Activation of the canonical Wnt/beta-catenin pathway in ATF3-induced mammary tumors." PLoS One **6**(1): e16515.
208. Yang, J. L. (2014). "Investigation of osteosarcoma genomics and its impact on targeted therapy: an international collaboration to conquer human osteosarcoma." Chin J Cancer **33**(12): 575-580.
209. Yang, L., X. Wu, Y. Wang, K. Zhang, J. Wu, Y. C. Yuan, X. Deng, L. Chen, C. C. Kim, S. Lau, G. Somlo and Y. Yen (2011). "FZD7 has a critical role in cell proliferation in triple negative breast cancer." Oncogene **30**(43): 4437-4446.
210. Yao, J. C., M. P. Eisner, C. Leary, C. Dagohoy, A. Phan, A. Rashid, M. Hassan and D. B. Evans (2007). "Population-based study of islet cell carcinoma." Ann Surg Oncol **14**(12): 3492-3500.
211. Yi, F., J. Sun, G. E. Lim, I. G. Fantus, P. L. Brubaker and T. Jin (2008). "Cross talk between the insulin and Wnt signaling pathways: evidence from intestinal endocrine L cells." Endocrinology **149**(5): 2341-2351.
212. Zeng, Z. Y., Y. H. Zhou, W. L. Zhang, W. Xiong, S. Q. Fan, X. L. Li, X. M. Luo, M. H. Wu, Y. X. Yang, C. Huang, L. Cao, K. Tang, J. Qian, S. R. Shen and G. Y. Li (2007). "Gene expression profiling of nasopharyngeal carcinoma reveals the abnormally regulated Wnt signaling pathway." Hum Pathol **38**(1): 120-133.
213. Zhang, J., R. Francois, R. Iyer, M. Seshadri, M. Zajac-Kaye and S. N. Hochwald (2013). "Current understanding of the molecular biology of pancreatic neuroendocrine tumors." J Natl Cancer Inst **105**(14): 1005-1017.
214. Zhao, Y. P., H. X. Zhan, T. P. Zhang, L. Cong, M. H. Dai, Q. Liao and L. X. Cai (2011). "Surgical management of patients with insulinomas: Result of 292 cases in a single institution." J Surg Oncol **103**(2): 169-174.

-
215. Zhuang, Z., A. O. Vortmeyer, S. Pack, S. Huang, T. A. Pham, C. Wang, W. S. Park, S. K. Agarwal, L. V. Debelenko, M. Kester, S. C. Guru, P. Manickam, S. E. Olufemi, F. Yu, C. Heppner, J. S. Crabtree, M. C. Skarulis, D. J. Venzon, M. R. Emmert-Buck, A. M. Spiegel, S. C. Chandrasekharappa, F. S. Collins, A. L. Burns, S. J. Marx, I. A. Lubensky and et al. (1997). "Somatic mutations of the MEN1 tumor suppressor gene in sporadic gastrinomas and insulinomas." Cancer Res **57**(21): 4682-4686.

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Sven Schinner möchte ich ganz herzlich für die Überlassung des vorliegenden Dissertationsthemas und seine stetige Unterstützung danken.

Dem ärztlichen Direktor der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie Prof. Dr. Wolfram T. Knoefel sowie den Herren Prof. Dr. Andreas M. Raffel und PD Dr. Markus Krausch danke ich für die Überlassung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gewebeproben.

Herrn Prof. Dr. Martin Anlauf danke ich für seine wertvolle Unterstützung bei der histologischen Interpretation und Beurteilung der Ergebnisse.

MTA Frau Birgit Mülders-Opgenoorth danke ich für ihre engagierte Hilfe und ihre Ratschläge im Rahmen der Einarbeitung in die Laborarbeit.