Fachbereich Medizin
- Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie -
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Professor Dr. med. M. Rothmund

Mikrosatellitenanalyse von Chromosom 11p mit Sequenzierung des Kandidatengens WT1 bei Neuroendokrinen Pankreastumoren

Inauguraldissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

Doktorarbeit vorgelegt von
Griet Marianne Hedwig de Haan
aus Solingen

Marburg im Juli 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
am 28. Juli, 2005

gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch
Referent: Prof. Dr. med. D. K. Bartsch
Co-Referent: Prof. Dr. Kunz

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 3

2. EINLEITUNG 4

2.1 Grundlagen Tumorgenese 4
2.1.1 Onkogene 4
2.1.2 Tumorsuppressor Gene 6
2.1.3 Verlust von Heterozygotie (Loss-of-Heterozygosity (~LOH)) 7

2.2 Pankreas 8

2.3 Neuroendokrine Pankreastumoren (NPTs) 9
2.3.1 Insulinome 14
2.3.2 Gastrinome 15
2.3.3 VIPome 16
2.3.4 Nicht-funktionelle NPTs 17
2.3.5 Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1 (*MEN1*) 18

2.4 Molekulargenetische Grundlagen von sporadischen Neuroendokrinen Pankreastumoren (NPTs) 19

2.5 Molekulargenetische Grundlagen von 11p 25

3. ZIEL DER ARBEIT 29

4. MATERIAL UND METHODEN 30

4.1 Patienten und Gewebeproben 30

4.2 Gewinnung von DNA 31
4.2.1 Blut DNA Extraktion mit dem QIAamp Tissue Kit (Qiagen) 31
4.2.2 DNA Extraktion aus Vollblut 32
4.2.3 Gewebe DNA-Extraktion mit dem QIAamp Tissue Kit (Qiagen) 32
4.2.4 Aufreinigung einer DNA-Probe/ Proteinase K-Verdau 33

4.3 Mikrosatellitenanalyse 33
4.3.1 Auswahl geeigneter Mikrosatellitenmarker 33
4.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 36
4.3.3 Verwendete Agentien für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) 37
4.3.4 Optimierung der PCR und Zusammenfassung der PCR-Bedingungen für LOH-Analyse 38
4.3.5 Gelelektrophorese 39
4.3.6 Loss of Heterozygosity (LOH)-Analyse 40
4.3.7 Mikrosatelliteninstabilität 40
4.3.8 Fractional allelic loss (~FAL) 40

4.4 Zwei Methoden der LOH-Bestimmung 41
4.4.1 LOH über radioaktive Markierung 41
4.4.1.1 Radioaktive Markierung des Primers 41
4.4.1.2 Polyakrylamidgel für die Mikrosatellitenanalyse 42
4.4.2 LOH über automatische Sequenzierung 44
4.4.2.1 Markierung des Primers mit einem Fluoreszenz-Amidit 44
4.4.2.2 Durchführung der fluoreszenzunterstützten Alleltypisierung auf dem ABI 310 Genetic Analyzer 44

4.5 Sequenzierung von WT1 47
4.5.1 Single Strand Conformation Analysis (SSCA) des *WT1-Gen*s 48
4.5.1.1 Agarosegelelektrophorese 50
4.5.1.2 Gelextraktion mit QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen (Cat. No. 28706) 51
4.5.1.3 Konzentrationsbestimmung der DNA mittels „Tüpfelplatte“ 51
4.5.1.4 „Fällung“ 52

4.6 Statistik 52

4.7 Sicherheitsmassnahmen und Datenschutz 53

5. ERGEBNISSE 54

5.1 Loss Of Heterozygosity (LOH) - Analysen 54

5.2 Mutationsanalyse des Kandidatengens *WT1* 71
5.2.1 Single Strand Conformation Analysis (SSCA) und direkte DNA-Sequenzierung 71
5.2.2 Beziehung zwischen Allelverlust und Klinik 77

6. DISKUSSION 80

7. ZUSAMMENFASSUNG 87

8. LITERATURVERZEICHNIS 88

9. LEBENSLAUF 103

10. DANKSAGUNG 104

11. ANHANG 105

11.1 Eidesstattliche Erklärung 105

11.2 Akademische Lehrer 106

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CGH	Comperative genomic hybridization
cm	Zentimeter
CTP	Cytosintriphosphat
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-acetic acid
d.h.	das heißt
DNA	desoxyribonucleinacid
et al.	und Andere (frei übersetzt: und Mitarbeiter)
FAL	fractional allelic loss
insg	insgesamt
Kap.	Kapitel
LOH	Verlust von Heterozygosität (Loss of heterozygosity)
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
NPTs	Neuroendokrine Pankreastumoren
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomografie
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SSCA	single strand conformation analysis
sec	Sekunden
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N´,N´-Tetraethyl-methylen-diamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aimonethan
U	Unit
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
V	Volt
Vol.	Volumen/ Ausgabe

2. Einleitung

2.1 Grundlagen Tumorgenese

Krebs ist die allgemeine Bezeichnung für eine bösartige Neubildung. Zugrunde liegt eine Erkrankung, die sich durch genetische Instabilität und unkontrolliertes Wachstum auszeichnet (Stass und Mixson, 1997). Eine DNA-Sequenz eines gesunden Menschen (Wildtyp) reguliert in einem komplexen Zusammenspiel die Funktionen einer Zelle. Eine entscheidende Stellung nehmen dabei anscheinend die Proto-Onkogene und die Tumorsuppressorgene ein (Weinberg, 1991). Ungehemmte Zellproliferation, sogar unter ungünstigen physiologischen Bedingungen und auch in völlig untypischer Umgebung (Metastasen), und neuerworbene Eigenschaften bei Tumorzellen leiten sich aus einer Veränderung der Proto-Onkogene in Onkogene und/oder einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen ab. Zugrunde liegt eine Veränderung in der normalen DNA durch Mutationen, Deletionen oder Translokationen (Stass und Mixson, 1997). Für eine Reihe von verschiedenen Tumoren hat sich ein mehrschrittiger Prozess bei der Tumorentstehung herausgestellt, bei dem sowohl Veränderungen in Proto-Onkogenen, als auch in Tumorsuppressorgenen kombiniert auftreten (Weinstein, 1977; Weinberg, 1989). Einige Studien gehen von mehrschrittigen genetischen Veränderungen aus, die letztlich eine bösartige Neoplasie hervorrufen (u.a. Evers *et al.*, 1994).

2.1.1 Onkogene

Entscheidende Hinweise zur Aufklärung der molekularen Struktur und zur funktionellen Charakterisierung der Onkogene kamen bereits 1910 von Rous aus dem Bereich der Virologie (Rous *et al.*, 1910). Er legte den Grundstein zur Erkenntnis, dass Retroviren ihre Erbinformation in Form von RNA mit Hilfe eines viruseigenen Enzyms, der Reversen Transkriptase, in DNA umschreiben und damit eine Umwandlung der Zelle in eine Tumorzelle, durch Veränderung des Genproduktes, auslösen können. Zusätzlich zu der üblichen Erbinformation, die zur Struktur und Vermehrung des Virus benötigt wird, sollten einige Retroviren zusätzlich ein Gen, was zur Umwandlung der Zelle in eine Tumorzelle führt, besitzen (Rous *et al.*, 1910; Schartl *et al.*, 1998).

Huebner und Todaro formulierten später die Hypothese, dass Krebsgene der Retroviren auch zur genetischen Ausstattung aller Zellen höherer Organismen zählen. Erst äußere Reize sollten zum unkontrollierten und übermäßigen Wachstum der Zelle führen (Huebner und Todaro, 1969; Schartl *et al.*, 1998).

Bishop und Varmus bestätigten schließlich 1976 diese Theorie mit Hilfe einer radioaktiv markierten Nucleinsäurensonde vom viralen Rous-sarcoma-virus (src)-Gen. In völlig gesunden Zellen gab es Genabschnitte, die mit den Proto-Onkogenregionen der Viren identisch waren (Stehelin *et al.*, 1976).

Im Gegensatz zur von Huebner und Todaro postulierten Theorie, wird heute davon ausgegangen, dass Proto-Onkogene nicht Relikte von viralen Tumorgenen, sondern über lange Evolutionsräume entwickelte Gene, mit wichtigen physiologischen Funktionen in der normalen Körperzelle sind (Bishop, 1985; Schartl et al., 1998).

So sind die meisten Genprodukte von Proto-Onkogenen an der Signaltransduktionskaskade beteiligt, die ein externes Wachstumssignal in einen Proliferationsstimulus für die Zelle umsetzen. Sie stellen sich in Form von Wachstumsfaktoren (z.B. c-sis, platelet-derived growth factors, Kst-1/K-fgf) und Wachstumsrezeptoren (z.B. erb-B1, erb-B2 (~HER-2 oder neu)), die eine Rolle bei der Entstehung von Glioblastomen, Gehirntumoren, Brusttumoren, bzw. Brusttumoren, Gebärmuttertumoren oder Speicheldrüsentumoren spielen, dar. Des Weiteren zählen Signalüberträger, die GTP-bindenden Onkogene H-, K- und N-ras und auch die Transkriptionsregulatoren zu den Onkogenen. In den programmierten Zelltod direkt sind nach heutigem Kenntnisstand lediglich das Onkogen bcl-2 und das Tumorsupressorgen p53 einbezogen (Stass und Mixson, 1997).

Die Umwandlung eines Proto-Onkogens in ein Onkogen wird durch Mutationen, also Punktmutationen (20% aller untersuchten Tumoren zeigen Punktmutationen in der ras-Familie), Deletionen, Rearrangement der DNA, z.B. durch Translokationen, Fusionen, Genduplikationen, Amplifikationen der DNA oder viral bedingte Promotorinsertionen hervorgerufen (Schartl *et al.*, 1998). Onkogene werden entweder immer durch denselben Auslöser oder aber in verschiedenen Tumoren durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert. Ein Zusammenspiel verschiedener Möglichkeiten der Onkogenaktivierung wird vermutet. Ebenfalls existiert eine Mehrschritthypothese der Tumorentstehung, die von einer spezifischen Onkogenaktivierung in unterschiedlichen Stadien des Tumorwachstums ausgeht. Das Phänomen, dass nur bestimmte Zelltypen oder Differenzierungsstadien durch ein Onkogen transformiert werden können, wird auch als Kompetenz der Zielzelle für die transformierte Aktivität des Onkogens bezeichnet. Ihre Kompetenz kann die Zelle also durchaus auch von auf den ersten Blick nicht-mutagenen, exogenen Substanzen erlangen. Unter Umständen führt die Stoffwechsellage die Zelle in ein kompetentes Stadium (Schartl *et al.*, 1998).

2.1.2 Tumorsuppressor Gene

Tumorsuppressorgene sind die Gegenspieler von Onkogenen (Stass und Mixson, 1997). Ihr Vorkommen scheint sich auf Wirbeltiere zu konzentrieren, weshalb angenommen wird, dass Tumorsuppressorgene in der Evolution weniger hoch konserviert sind als Onkogene. Grundsätzlich haben Tumorsuppressorgene die Funktion der inhibitorischen Regulation des Zellwachstums, welche sich sowohl auf die Zelle selbst, als auch auf deren Einfluss auf andere Zellen bezieht. Um diese Funktion zu verlieren, muss ein Verlust beider Allele vollzogen sein, was auf eine Rezessivität von Tumorsuppressorgenen hinweist (Stanbridge *et al.*, 1990).

Dies wurde bereits 1971 von Knudson in der Zwei-Schritt-Hypothese (Two-Hit-Hypothesis) postuliert (Knudson, 1971). Es wurde erkannt, dass eine Zelle zwei Mutationen an dem selben Genort auf unterschiedlichen Allelen erhält, welche allerdings nicht unbedingt zur gleichen Zeit auftreten müssen. An Untersuchungen am familiären Retinoblastom stellte Knudson eine erste Mutation bereits in der Keimbahn fest. Die zweite Mutation ereignet sich somatisch, in einer frühen Vorläuferzelle des Tumor-Ursprungsgewebes (Knudson *et al.*, 1972; Weinberg *et al.*, 1991). Die Wahrscheinlichkeit für die zweite, somatische Mutation beim familiär auftretenden Tumor ist hoch und so erklärt man sich das oft multifokale Auftreten. Dagegen ist eine beide Allele betreffende Mutation in einer somatischen Zelle äußerst selten, womit sich das eher solitäre Auftreten von sporadischen Tumoren verstehen lässt (Cavanee *et al.*, 1983).

Tumorsuppressorgene können durch unterschiedliche Ereignisse in ihrer Wirkweise gestört werden. So gibt es Viren, die mit Hilfe ihrer DNA die ursprüngliche Funktion der Tumorsuppressorgene blockieren können (Nevins, 1992; Weinberg, 1995). Ebenso wie bei der Entstehung von Onkogenen können aber auch Mutationen, Punktmutationen, Deletionen oder Neuanordnungen der DNA die Tumorsuppressorgene beeinflussen (Lewin *et al.*, 1998; Schartl *et al.*, 1998). Grundsätzlich gilt, dass das Tumorsuppressorgen in einem bestimmten Entwicklungsstadium der Zelle ausfallen muss, um eine Tumorbildung zu induzieren. Die Zelle erhält damit, wie auch bei Onkogenen, die Kompetenz für die neoplastische Transformation durch ein bestimmtes Gen (Schartl *et al.*, 1998). Im Allgemeinen kodieren Tumorsuppressorgene für Proteine, die an Zelladhäsion, Signaltransduktion, Transkription, Translation und Zellzykluskontrolle beteiligt sind (Weinberg, 1991). Sie sind also keinesfalls zweckgerichtet auf die Unterdrückung eines neoplastischen

Transformationsereignisses, sondern vielmehr Entwicklungsgene, die in die Kontrolle der Proliferation oder Differenzierung des bestimmten Zelltyps physiologisch involviert sind. So erklärt sich die strikte Spezifität der Gene für einen einzigen oder wenige Tumortypen (Schartl *et al.*, 1998).

Anhand von Funktionsverlustmutationen (‚loss-of-function'; Stanbridge, 1976; Weinberg, 1991), bzw. Karyotypenanalysen (Weinberg, 1991; Stass und Mixson, 1997) stellte sich heraus, dass die Tumoren mit Tumorsuppressorgen- Verlust regelmäßig zwei identisch mutierte Tumorsuppressorgene auf beiden Allelen aufweisen. Dies wurde vermutlich hervorgerufen durch mitotische Rekombination oder nicht-auseinanderweichen der Chromosomen in Teilungsphasen der Zellen. Miteinbezogen wurden bei diesen Zellteilungsaberrationen auch die umliegenden chromosomalen Regionen, wodurch die Analyse von Mikrosatellitenregionen (LOH-Analyse) sinnvoll wurde (Weinberg, 1991). Die therapeutischen Möglichkeiten bei Kenntnis der Tumorsuppressorgen-loci sind derzeit noch begrenzt. Zukunftspläne befassen sich gentherapeutisch mit dem Einbau von Tumorsuppressorgenen in DNA mit Hilfe von Trägersystemen, die evtl. Retroviren bieten (Fujiwara *et al.*, 1994 (für p53)). Der Einsatz von Tumorsuppressorgen-Protein als therapeutisches Agenz, verspricht z.B. in *in-vitro* Versuchen mit dem Retinoblastom-Gen in DNA von Leukämie-Patienten tumorunterdrückende Wirkung (Pagliaro *et al.*, 1995). So befassten sich 1994 Yanuck und Mitarbeiter mit dem Gedanken, das Tumorsuppressorgen p53, durch Mutanten hergestellt, wie einen Impfstoff einzusetzen (Yanuck *et al.*, 1994).

2.1.3 Verlust von Heterozygotie (Loss-of-Heterozygosity (~LOH))

Die wiederholte Beobachtung angrenzender chromosomaler Mikrosatelliten-Regionen führte zu der Erkenntnis, dass gehäuft Verlust von Heterozygotie (LOH) und Homozygotie, verkürzte oder verlängerte Mikrosatelliten, in Kombination mit einem Defekt eines Tumorsuppressorgens auftreten (Hansen *et al.*, 1987; Weinberg, 1991). Bei einem Verlust von Heterozygotie (LOH) handelt es sich um den Wegfall eines Allels, entweder des Vaters oder der Mutter, im Bereich von hochrepetetiven DNA-Sequenzen, was letztlich zum homozygoten Vorliegen der noch vorhandenen DNA-Sequenz führt. Dieser Allelverlust wird oft eher durch eine verringerte relative Intensität als das völlige Verschwinden der Bande eines Allels sichtbar, da die meisten pathologischen Tumorproben eine Mixtur von Tumor- und Stromagewebe enthalten.

Die DNA von gesundem Gewebe dient dabei zum Vergleich. Durch systematisches, paarweises Durchmustern von Blut- und Tumorproben können mutmaßliche Lokalisationen von Tumorsuppressorgenen entdeckt werden. Wenn allerdings bereits die konstitutionelle Blut-DNA homozygot für einen bestimmten Mikrosatelittenabschnitt ist, resultiert dies in einem nicht-informativen Ergebnis.

2.2 Pankreas

Das Pankreas ist eine gemischt exokrin-endokrine Drüse. Es entwickelt sich während der Organogenese aus einer ventralen und einer dorsalen Pankreasanlage, welche gegen Ende des 2. Embryonalmonats verschmelzen (Schiebler *et al.*, 1995). Die ventrale Anlage entstammt der epithelialen Duodenalwand und bildet vorwiegend den Pankreaskopf und *Processus uncinatus*, während sich die dorsale Anlage aus der dorsalen Wand des hepatopankreatischen Ringes entwickelt und Pankreaskörper, -schwanz, sowie Teile des Kopfes formt (Skandalakis, 1989). Der Ausführungsgang, Duktus pancreaticus, entstammt im Körper und im Schwanzbereich der dorsalen, im Kopf dagegen aus der ventralen Pankreasanlage (Schiebler *et al.*, 1995).

Normalerweise findet eine Verschmelzung der beiden Pankreasanteile statt, so dass es zur Nutzung des ventralen Ganges als gemeinsamen Ausführungsgang mit Mündung in der Vater´schen Papille kommt. In rund 95% der Fälle ist der ca. 20 cm lange Ductus pancreaticus major (Wirsungianus) der Hauptdrainageweg für das gebildete Pankreassekret (Sugawa *et al.*, 1987)

Das Pankreas eines erwachsenen Menschen ist 13-18 cm lang und wiegt 70-100 g. Es liegt aufgrund seines duodenalen Ursprungs retroperitoneal in Höhe des 1. und 2. Lendenwirbels und windet sich von der C-förmigen Konkavität der Duodenalschleife, in die der Pankreaskopf eingebettet ist, mit Korpus und Schwanzanteil bis hin zum Milzhilus. Nach ventral bildet das Tuber omentale die Rückseite der Bursa omentalis, wo hingegen dorsal das Pankreas durch die grossen Bauchgefässe und die Wirbelsäule begrenzt wird. Eine zentrale Bedeutung bekommt das Pankreas durch die nachbarschaftlichen Beziehungen zu wichtigen Gefässstrukturen im Bauchraum. So umschliessen Pankreaskörper und der hakenförmige Fortsatz des Pankreaskopfes, Processus uncinatus die Arteria und Vena mesenterica superior, bevor die Vene gemeinsam mit der Vena splenica die Pfortader bildet. Weiterhin läuft der Ductus choledochus durch Pankreasgewebe des Pankreaskopfes in das Duodenum (Schiebler *et al.*, 1995).

Funktionell besitzt das Pankreas sowohl einen endokrinen als auch einen exokrinen Anteil. Bei diesem exokrinen Anteil handelt es sich um eine rein seröse Drüse, die traubenförmig in äusserlich sichtbare Läppchen gegliedert ist und 98% des Gewebes der Bauchspeicheldrüse ausmacht. Sezerniert werden hier täglich ca. 2-3 Liter Pankreassaft, der neben Bikarbonat zur Pufferung von Magensäure mehr als zwanzig verschiedene Verdauungsfermente, wie Elastase, Lipase, Ribonuklease, Pankreas-a-Amylase, sowie die proteolytischen Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Carboxypeptidase A und B in teilweise inaktiver Vorstufe. Die Fermente werden dann erst im Dünndarm aktiviert, womit eine Selbstverdauung der Bauchspeicheldrüse verhindert wird. Die jeweilig erforderliche Zusammensetzung des Pankreassaftes wird hormonell gesteuert. Somit spielt das Pankreas bei der Verdauung von Nahrungsmitteln eine zentralen Rolle (Schiebler *et al.*, 1995).

Der endokrine Teil wird von den Langerhans-Inseln gebildet, die 2% der Bauchspeicheldrüse ausmachen und zuerst von 1869 von Paul Langerhans beschrieben wurden (Langerhans, 1869). Entwicklungsgeschichtlich entstanden sind die ca. 0,5 bis 1,5 Millionen Inselzellen aus neuronal programmiertem Ektoderm. Langerhans-Inseln bestehen in 20-30% aus sogenannten A-Zellen, die Glukagon herstellen, in 50-80% aus B-Zellen, die Insulin, in 2-8% aus D-, die Somatostatin und zu einem geringen Teil aus PP-Zellen, die pankreatisches Polypeptid bilden (Bucher, 1980). Insulin und Glukagon spielen eine wichtige Rolle im Kohlenhydrathaushalt, wobei Somatostatin und pankreatisches Polypeptid v.a. die Darmmotilität, die Salzsäureproduktion im Magen und die Exkretion des Pankreas selbst steuern. Die Hormone des endokrinen Pankreas gelangen venös zu den Organen des Körpers.

2.3 Neuroendokrine Pankreastumoren (NPTs)

Neuroendokrine Pankreastumoren (NPTs) sind selten auftretende Tumoren. Lediglich 1-5% der Tumoren des Pankreasgewebes sind Neuroendokrine Pankreastumoren (Klöppel *et al.*, 1993). Unter dem Begriff der NPTs werden alle Inselzelltumoren zusammengefasst, da sie einige gemeinsame biologische Eigenschaften, sowie gemeinsame Pathologie, Wachstumsverhalten, Tumorlokalisation, Behandlungsweise, sowie die Fähigkeit klinische Syndrome hervorzurufen, haben (Jensen, 1999). Eine Einteilung der NPTs richtet sich charakteristischerweise nach der von ihnen hervorgerufenen Klinik, weshalb zunächst zwischen funktionell-aktiven und funktionell-inaktiven Tumoren unterschieden wird (Jensen, 1999). Die Inzidenz der

NPTs wird auf 0,4/ 100.000 geschätzt, wobei in 30-40% der NPTs nicht-funktionelle Tumoren vorliegen (Eriksson und Öberg, 2000). Sie zeigen ein eher unspezifisches klinisches Bild, woraus jedoch keine konkreten Rückschlüsse auf ihre Hormonaktivität gezogen werden können (Jensen, 1999; Eriksson und Öberg, 2000). Das heißt, es gibt durchaus „hormonaktive" NPTs, die nicht-funktionell sind.

Die sogenannten funktionellen NPTs lassen sich wiederum, je nach Lokalisation und Art der sezernierten Hormone, in verschiedene Typen einteilen: Insulinome, Gastrinome (Zollinger-Ellison-Syndrom), VIPome (Verner-Morrison-Syndrom, WDHA, pankreatische Cholera), Glukagonome, Somatostatinome, ACTH-freisetzende Tumoren, pankreatisches polypeptid-sezernierende Tumoren, serotonin-produzierende und kalzitoninsezernierende NPTs, wobei die folgende Tabelle 1 eine Zusammenstellung über ihre Häufigkeit gibt (Jensen, 1999).

Tabelle 1: **Mit NPTs assoziierte klinische Syndrome**

1. Teil

Name	sezerniertes biologisch aktives Peptid	Inzidenz (Fälle/ 10^6 Bevölkerung/ Jahr) relative Häufigkeit (%)	Tumorlokalisation	Malignität
funktionelle NPTs:				
Zollinger-Ellison Syndrom/Gastrinom	Gastrin	0,5-1,5/ 20%	Duodenum 70% Pankreas 25% Übrige 5%	60-90%
Insulinom	Insulin	1-2/ 30%	Pankreas >99%	<10%
Vipom	VIP (vasoaktives intestinales Peptid)	0,05-0,2/ 10%	Pankreas 90%, bei Erwachsenen Übrige 10%	40-70%
Glukagonom	Glukagon	0,01-0,1/ 5%	Pankreas 100%	50-80%
Somatostatinom	Somatostatin	selten	Pankreas 55% Duodenum/Jej. 45%	>70%
GRFom	Wachstumshormon-Releasing-Faktor	unbekannt	Pankreas 30% Lunge 54% Jejunum 7% Übrige 13%	>60%
ACTHom	ACTH	selten	Pankreas	>95%
Karzinoid	Serotonin	selten	Pankreas <1% aller Karzinoide	60-88%

2. Teil

Name	sezerniertes biologisch aktives Peptid	Inzidenz (Fälle/ 10^6 Bevölkerung/ Jahr) relative Häufigkeit (%)	Tumorlokalisation	Malignität
Hyperkalziämie auslösender NPT	unbekannt	selten	Pankreas	84%
Kalzitonin produzierender NPT	Kalzitonin	selten	Pankreas	>80%
nicht-funktioneller NPT:				
insgesamt		35%		60%
PPom	Pankreatisches Polypeptid	1-2	Pankreas 100%	>60%

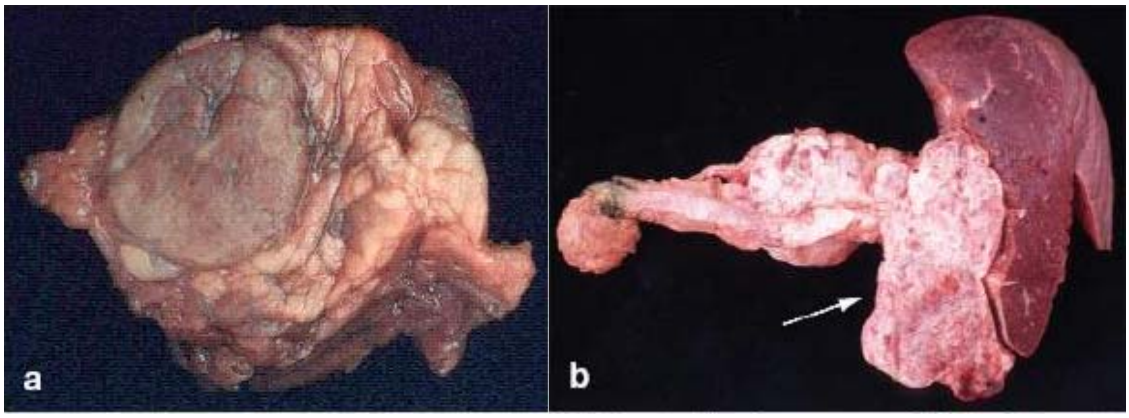
Quelle: Jensen, 1999

Vor allem zur Diagnose von nicht-funktionellen Pankreastumoren stellte sich die Entdeckung von spezifischen Tumormarkern als hilfreich heraus. In 94% aller neuroendokrinen Pankreastumoren liegen erhöhte Chromogranin A-Werte, einem Glykoprotein vorwiegend aus endokrinen Zellen, vor (Eriksson *et al.*, 1990; Stridsberg *et al.*, 1993; Jensen, 1999). Weitere Tumormarker, wie das Pankreatische Polypeptid (PP) und HCG-α und -β Untereinheiten, oder auch die neuronenspezifische Enolase und Syphtophysin, sowie der Proliferationsmarker Ki-67 unterstützen den Tumornachweis (La Rosa *et al.*, 1996; Öberg, 1999). Unter Einsatz von immunhistochemischen Färbemethoden werden die beschriebenen Markermoleküle und damit auch die neuroendokrinen Tumorzellen sichtbar gemacht (Höfler *et al.*, 1986).

Eine hohe Dichte von 80-90% an Somatostatin-Rezeptoren wurde bei NPTs festgestellt (Jensen, 1999), was die therapeutische Nutzbarkeit von Somatostatinanaloga und den diagnostischen Einsatz von [^{111}In-DTPA-DPhe]Octreotid Scintigraphy (Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie), womit mittlerweile 90% der nicht-funktionellen NPTs erkannt werden, erklärt (Eriksson und Öberg, 2000). Die Positronen Emissions Tomographie (PET) kann durch vorherige Bindung von 5-Hydroxytryptophan an Serotoninrezeptoren manchmal selbst sehr kleine Tumoren, die mit anderen bildgebenden Verfahren unentdeckt bleiben, sichtbar machen (Eriksson et Öberg, 2000). Zusätzlich ist es mit der äußerst sensiblen PET-Methode möglich den Effekt der Tumortherapie in bezug auf biochemische und funktionelle Variable zu überwachen (Eriksson *et al.*, 1998).

Trotz der aufgeführten diagnostischen Möglichkeiten, werden sowohl die nicht-funktionellen, als auch die funktionellen NPTs durchschnittlich erst 4-6 Jahre nach ihrer Entstehung diagnostiziert (Jensen, 1998), was möglicherweise am meist nicht-schmerzhaften und eher unspezifischen Krankheitsbild liegt. Die Diagnose eines funktionell aktiven NPTs lediglich anhand des immunzytochemischen Hormonnachweises stellt sich auch heute noch als schwierig dar, denn erst das entsprechende klinische Syndrom bestätigt das Vorliegen eines bestimmten neuroendokrinen Pankreastumors (Tab 1). Dementsprechend fällt die Diagnose häufig erst bei Metastasierung des Tumors. Die Mortalität hängt heutzutage weniger mit der Hormonproduktion des Tumors, als mit einem Leberversagen aufgrund von Metastasierung zusammen, die über den Weg der regionalen Lymphknoten zur Leber erfolgt (Yu *et al*., 1999). Nach Nachweis von Metastasen beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit 4 Jahre, wobei aufgrund des generell langsamen Wachstums von NPTs auch Verläufe von bis zu 20 Jahren möglich sind (Klöppel *et al.*, 1993).
Ein NPT stellt sich in 80-90% der Fälle als solitärer runder Tumor mit einem Durchmesser zwischen 1-5 cm dar (Klöppel, 2003).

Abbildung 1:



a) benignes Insulinom (Tumordurchmesser < 2 cm) (Insulinom);
b) malignes Insulinom (Tumordurchmesser 4 cm) mit Infiltration des peripankreatischen Fettgewebes(Pfeil)

Er imponiert durch einen hohen Bindegewebsgehalt, der eine festere Konsistenz des Tumors im Vergleich zum übrigen Gewebe des Pankreas bewirkt (Klöppel, 2003).
Mikroskopisch bestehen die klassischen (differenzierten) neuroendokrinen Tumoren des Pankreas aus homogenen kleinen, runden Anordnungen von Zellen mit einheitlichem

Zellkern und Zytoplasma, sowie relativ seltenen Mitosen. Deshalb sind sichere Malignitätskriterien auf Tumorinvasion oder Metastasennachweis in Gefäße oder Nerven beschränkt. Weitere Malignitätskriterien eines NPT stellen Zell- und Mitosenreichtum (bei niedrig bis undifferenzierten NPTs) und ein hoher Ki-67 Proliferationsindex als Darstellung des Wachstumspotentials des Tumors dar (La Rosa *et al.*, 1996; Capella *et al.*, 1997; Jensen, 1999).

Als Therapie der Wahl wird nach wie vor die chirurgische Intervention angesehen (Gorgone *et al.*, 1999). Hierbei sollte stets eine kurative Resektion angestrebt werden (Eriksson und Öberg, 2000), selbst wenn bereits eine limitierende Lebermetastasierung vorliegt, da auch in diesen Fällen recht hohe 5-Jahres-Überlebensraten mit guter Lebensqualität zu erwarten sind (Varshney *et al*., 2000).

Die in den letzten Jahren verbesserten Therapiemöglichkeiten liegen auf hormoneller Ebene. Alle zuvor angesprochenen Diagnoseverfahren spielen auch bei der Therapie eine Rolle. So wirkt z.B. eine Therapie mit dem Somatostatin-Analogon Octreotid besonders bei VIP- und Glukagon-produzierenden Tumoren (Eriksson und Öberg, 1999). Es reduziert die Plasmakonzentration vieler Hormone (Meko und Norton, 1994) und hat einen offensichtlich eingeschränkten Effekt auf das Tumorwachstum (Eriksson und Öberg, 1999; Arnold *et al.*, 2000). Die Hochdosis-Somatostatin Analogatherapie (die eingesetzte Dosis beträgt >3000 µg/d), die v.a. bei Patienten eingesetzt wird, die nicht auf die Standard-Octreotid Therapie ansprechen, ruft eine Apoptose von Tumorzellen hervor (Eriksson und Öberg, 2000). Auch radioaktiv-markierte Somatostatin-Analoga werden getestet, obwohl derzeit eine Resistenz von NPTs gegenüber Radioaktivität angenommen wird (Eriksson und Öberg, 2000).

Aus chemotherapeutischer Sicht wird seit einigen Jahren auf eine Kombination der Präparate Streptozytocin mit 5-Fluorouracil oder Doxorubicin bei der Behandlung von funktionellen, sowie nicht-funktionellen Tumoren gesetzt (Eriksson und Öberg, 1993).

Eine andere Alternative bietet die zusätzliche Gabe von killerzellstimulierendem α-Interferon (IFN) zu Somatostatin-Analoga (Eriksson und Öberg, 2000). IFN hat sich durch seine Fähigkeit zur Killerzellstimulation, der Kontrolle über Hormonsekretion, Produktion von Wachstumsfaktoren und Tumorrezeptoren als Therapie für Karzinoide durchgesetzt (Eriksson und Öberg, 2000). In NPTs bewirkt es vielmehr eine Tumorstabilisation in bis zu 80% und eine Tumorgression in bis zu 15% der Fälle (Eriksson und Öberg, 1993).

Bei langsam wachsenden NPTs, die nicht vollständig resektabel sind, besitzt das chirurgische Debulking oder die arterielle Embolisation einen hohen Stellenwert (Engelhardt *et al.*, 1997). Eine effizientere Behandlung von NPTs wird mit der Arbeit zur Feststellung von Früherkennungsmaßnahmen angestrebt. Dazu werden vor allem einheitliche Veränderungen im Genom gesucht und untersucht, um daraus auf lange Sicht einen Nutzen für zukünftige Screeningmethoden der jeweiligen Tumoren zu ziehen. Einen ersten Schritt stellt dabei die LOH-Analyse dar, die in dieser Arbeit angewendet wurde.

2.3.1 Insulinome

Zum ersten Mal wurde das Krankheitsbild des Insulinoms im Jahre 1927 von Wilder und seinen Mitarbeitern beschrieben (Wilder *et al.*, 1927). Insulinome verursachen eine unkontrollierte, vom Blutzuckerspiegel unabhängige Insulinproduktion. Insulinome machen etwa 40-70% der endokrin aktiven Pankreastumoren aus. Sie treten gehäuft in der Altersgruppe zwischen 30 und 60 Jahren in einem ausgeglichenen Frauen/Männer-Verhältnis auf und sind bei Kindern unter dem 15. Lebensjahr selten zu finden (Klöppel, 2003). In der Regel bilden Insulinome solitäre Adenome (>90%). Bei Auftreten, wie in 2-5% der Krankheitsfälle beobachtet, von 2 oder mehr Insulinomen, sollte immer auch das Vorliegen eines *MEN*-Syndroms Typ 1 (Multiple Endokrine Neoplasie, *MEN1*) in Betracht gezogen werden (*MEN1*, Kap 3.3.5). Lediglich in 5-10% der Fälle liegen maligne Insulinome vor (Beyer, 1983; Service *et al*., 1991).

Makroskopisch imponieren die solitären Tumoren als runde gut begrenzte Zellkonglomerate mit einem Durchmesser von 1-2 cm (Donow *et al.*, 1990). Die bevorzugte Lokalisation der Insulinome ist das Pankreas (99%) (Tiling *et al.*, 2002), wobei gelegentlich der Tumor dem Pankreas von außen aufsitzen kann. Extrapankreatische Lokalisationen sind extrem selten, aber dennoch z.B. an der Duodenalwand oder im Milzhilus in ca. 2% der Fälle möglich (Donow *et al.*, 1990).

Mikroskopisch treten bei Insulinomen nicht nur ein typisches überwiegend solides oder trabekuläres Muster und ein hyalinisiertes und gelegentlich stark vaskularisiertes Stroma auf, sondern auch eine ausgedehnte Amyloidablagerung in 3-5% der Tumoren. Es handelt sich um Präzipitationen des mit Insulin ko-sezernierten Inselzell-Amyloid-Polypeptit (IAPP), auch Amylin genannt (Klöppel, 2003).

Immunhistologisch sind 50% der Tumoren monohormonal und in den übrigen Tumoren kann der Nachweis von Insulin und Proinsulin (Roth *et al.*, 1992), sowie dem C-Peptid auch Glukagon, Pankreatisches Polypeptid oder anderen Hormonen erbracht werden (Meko und Norton, 1994).

Charakteristisch für Insulinome ist das Auftreten einer breiten Palette unspezifischer Symptome aus der die wegweisenden Beschwerden schon im Jahre 1942, 1944 von Herrn Whipple beschrieben wurden (Whipple, 1942, 1944). Morgendliche Anfälle von Verwirrtheit und Bewusstseinsstörungen, Blutzuckerwerte unter 40 mg/dl und Aufhebung der Symptomatik durch Glucosegabe sind maßgebliche Inhalte der sogenannten Whipple Trias.

Als diagnostisches Mittel der Wahl erwies sich der Hungerversuch über maximal 72h, bei dem 95-98% der Patienten mit einer symptomatischen Hypoglykämie und Blutzuckerwerten unter 40 mg/dl reagieren (Siewert *et al.*, 2000).

Die sensitivste Methode zur Präoperativen Lokalisationsdiagnostik ist die Endosonographie, gefolgt von der Dünnschicht Spiralcomputertomographie. Allerdings können mehr als 95% der Insulinome durch intraoperative bidigitale Palpation des Pankreas in Kombination mit intraoperativem Ultraschall (IOUS) detektiert werden. Die Therapie der Wahl stellt die Tumorenukleation dar, bei Insulinomen im Pankreasschwanz ist meist eine milzerhaltende Pankreaslinksresektion indiziert.

2.3.2 Gastrinome

Die Erstbeschreibung eines Gastrinoms fand im Jahre 1955 durch Zollinger und Ellison statt, die über die Kombination eines Pankreastumors mit rezidivierenden peptischen Ulzera berichteten (Zollinger und Ellison, 1955).

10-20% der endokrinen Pankreastumoren sind Gastrinome (Siewert *et al.*, 2000). Sie treten vorwiegend zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr, aber auch bei Kindern und sehr alten Menschen, auf. Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (Klöppel, 2003).

Makroskopisch imponiert das intrapankreatische (bevorzugt im Pankreaskopf) sporadische Gastrinom als solitärer, 2-4 cm großer Tumor. Vielfach liegt das Gastrinom aber auch im Duodenum, wobei neuere Studien sogar eine 3-4x (30-40% der Gastrinome) höhere Inzidenz von Duodenal-Gastrinomen erwähnen (Meko und Norton, 1994; Jensen *et al.*, 1999). *MEN1*-assoziierte Gastrinome befinden sich zu 90% im Duodenalbereich (Pipeleers-Marichal *et al.*, 1990; Donow *et al.*, 1990, 1991).

Mikroskopisch zeigt sich ein recht unspezifisches solides und/oder trabekulär-pseudoglanduläres Muster.
Immunhistochemisch lässt sich in allen Fällen Gastrin, gelegentlich Pankreatisches Polypeptid (PP), Glukagon und andere Hormone nachweisen (Klöppel, 2003).
Die typische Symptomatik mit rezidivierenden Magen-, bzw. Duodenalulcera hängt vor allem mit der unkontrollierten Gastrinproduktion zusammen, die zu einer Stimulierung der Parietalzellen des Magens mit Parietalzellhyperplasie und exzessiver Salzsäureproduktion führt (Isenberg *et al.*, 1973).
Die Diagnosesicherung erfolgt demzufolge durch Magensekretionsanalyse, Serumgastrinstimulationstest nach Gabe von Sekretin und histologischen Nachweis einer Belegzellhyperplasie. Die präoperative Lokalisation eines Gastrinoms gelingt mit Abdominal-Endosonographie und CT nur selten.
Allgemein liegt die Malignitätsrate der Tumoren bei 60-90%, wobei die pankreatischen Gastrinome mit Metastasen rascher progredient zu sein scheinen, als extrapankreatische Gastrinome. Auch ohne Therapie zeigen Patienten dennoch eine erstaunlich hohe 5-Jahres-Überlebensrate von mehr als 50%, weshalb eine Einteilung in aggressive und nicht-aggressive Tumoren, mit 10-Jahres-Überlebensraten von 30% und 96%, unternommen wurde (Weber *et al.*, 1995; Jensen *et al*., 1999). Therapeutische Mittel der Wahl ist die Tumorresektion mit Lymphadenektomie. Allerdings gelingt in lediglich 15% der Fälle eine dauerhafte biochemische Heilung (Deveny *et al*., 1983; Howard *et al*., 1990). Medikamentös lassen sich die Symptome des Zollinger-Ellison-Syndrom gut durch Gabe von PPI und Somatostatin beeinflussen. Das Ansprechen auf Chemotherapie ist im Gegensatz zum Insulinom deutlich schlechter (Morowitz *et al*., 1986).

2.3.3 VIPome

Verner und Morrison prägten 1958 mit der Beschreibung von zwei Fällen von Pankreastumoren in Kombination mit wässrigen Durchfällen, einer Hypokaliämie und einer stark verminderten Säureproduktion des Magens den bis in die 70er Jahre gebräuchlichen Namen, Verner-Morrison-, bzw. *WDHA*-Syndrom (Wässrige Durchfälle, Hypokaliämie, Achlorhydrie) oder auch pankreatisches Cholera-Syndrom (Verner und Morrison, 1958).

Vipome produzieren Vasoaktives Intestinales Polypeptid (VIP), ein Peptid aus 28 Aminosäuren. Mit einem Altersgipfel zwischen dem 40. bis 60. Lebensjahr, wobei etwa 66% Frauen betroffen sind (Capella *et al*., 1983), machen die VIPome einen 3%igen Anteil an NPTs aus (Klöppel, 2003).

VIPome liegen in 90% der Fälle als solitäre Tumoren mit einer Größe von 2-7 cm im Pankreasschwanzbereich vor (Wündrich *et al.*, 1988). Gelegentlich treten extrapankreatische VIPome bei Erwachsenen in Form eines Phäochromozytoms und bei Kindern als extraadrenale Ganglioneurome oder Neuroblastome auf (Klöppel et al., 1993).

Mikroskopisch besteht ein unspezifisches trabekuläres Muster. Immunhistologisch lässt sich in dieser Tumorentität neben dem VIP-Hormon zusätzlich PP und Prostaglandin E nachweisen. Die Diagnose des VIPoms stützt sich v.a. auf die Bestimmung von VIP im Serum und die typische Symptomatik (Siewert *et al.*, 2000).

Durch ihre Größe sind die Tumoren mit Hilfe von Abdomensonographie und Abdomencomputertomographie leicht darzustellen. Da die meisten Vipome maligne sind, ist die Therapie der Wahl eine onkologische Pankreasresektion, meist in Form einer Pankreaslinksresektion. Vor der Operation sollten Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt ausgeglichen werden, um Nierenversagen und akutem Herzversagen vorzubeugen.

2.3.4 Nicht-funktionelle NPTs

Etwa 30% der NPTs zeigen klinisch keine Überfunktionssyndrome und werden nur durch ihr Größenwachstum oder eine Metastasierung auffällig (Klöppel *et al.*, 1993; Madura *et al.*, 1997). Über 2/3 dieser Tumoren sind maligne und weisen häufig PP-Zellen oder Glukagonzellen auf (Klöppel, 2003). Die Bezeichnung nicht-funktionelle NPTs steht also meist für Tumoren, die keine Hormone sezernieren oder deren Hormone keinerlei spezifische Klinik hervorrufen (Jensen, 1999). Die Unterscheidung vom Karzinom des exokrinen Pankreas ist klinisch erst durch die Entwicklung histochemischer Methoden möglich geworden (Eckhauser *et al.*, 1986). Präoperativ lassen sich nicht-funktionelle NPTs aufgrund ihrer Größe (90% >3cm im Durchmesser) einfach mittels Abdomensonographie, Computertomographie oder Magnetresonanztherapie und SMS-Szintigraphie darstellen. Bei ca. 60% der Patienten

bestehen zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Fernmetastasen. Die anzustrebende Therapie ist die chirurgisch radikale Tumorentfernung (Eckhauser, 1986).

2.3.5 Multiple Endokrine Neoplasie Typ 1 (*MEN1*)

Die Multiple Endokrine Neoplasie (MEN) Typ 1, welche auch nach seinem Erstbeschreiber als Wermer-Syndrom bezeichnet wird, ist charakterisiert durch das Auftreten von endokrinen Tumoren im Pankreas und Duodenum, den Nebenschilddrüsen und selten der Hypophyse (Wermer, 1954; Komminoth *et al.*, 1998; Skogseid, 1997).

Das Krankheitsbild kann sporadisch oder familiär gehäuft auftreten, wobei ein autosomal dominanter Erbgang hoher Penetranz und variabler Expressivität angenommen wird (Bartsch *et al.*, 1999; Langer *et al.*, 2002). Chandrasekharappa und Mitarbeiter konnten 1997 auf dem langen Arm von Chromosom 11 (11q13) das ursächliche *MEN1*-Gen identifizieren, welches für das aus 610-Aminosäuren bestehende *MENIN*-Protein kodiert (Chandrasekharappa *et al.*, 1997). Kaji konnte zeigen, dass die Inaktivierung durch Einsatz gegenläufiger RNA der *MENIN*-Sequenz die Inhibition des umformenden Wachstumsfaktors-β (*TGFB*) auf das Zellwachstum antagonisiert. *MENIN* tritt in Verbindung mit *SMAD3* und gegenläufiges *MENIN* unterdrückt *TGFB* und *SMAD4* induzierte Transkriptionsaktivität, indem es *SMAD3/4*-DNA Bindungen an spezifische transkriptionelle Regulatorstellen unterdrückt. Diese komplizierten Mechanismen deuten auf einen möglichen Mechanismus für die Tumorgenese hin (Kaji *et al.*, 2001).

Das Haupterkrankungsalter beim *MEN1*-Syndrom liegt zwischen 20 und 40 Jahren, mit 50 Jahren sind mehr als 80% der Genträger erkrankt. Die Inzidenz wird auf 2-17 pro 100.000 Einwohner geschätzt (Raue, 1999).

Die Tumorentstehung beginnt meist in einem Organ des Körpers, wobei in über 90% die Nebenschilddrüsen, in 60-70% das Pankreas und in etwa 50% in der Hypophyse betroffen sind (Bartsch, 1999; Langer *et al.*, 2002). Je nach Tumorentität werden die entsprechenden Hormone in unkontrollierter Weise produziert und sezerniert. Sie beeinflussen wie die bereits beschriebenen endokrinen Tumoren den Hormonhaushalt des Körpers und kreieren so auch das facettenreiche Bild von unterschiedlichen Symptomen (Tab. 1; Raue, 1999).

Makroskopisch enthält das Pankreas beim *MEN1*-Syndrom im Gegensatz zum Solitärtumor, zahlreiche Mikroadenome (<0.5cm) und nur einzelne größere Tumoren (Klöppel *et al.*, 1986).

Die Diagnose stellt sich je nach Tumorart und basiert zu großen Teilen auf dem klinischen Erscheinungsbild des individuellen Patienten, wobei die inadäquate Hormonproduktion durch bereits beschriebene Nachweismethoden erkannt werden können (Raue, 1999). Als bildgebende Verfahren werden die Gängigen bei endokrinen Tumoren verwendeten genutzt, wobei die geringe Größe der Tumoren, speziell auch der Pankreastumoren, die Tumorlokalisation erschwert.

Therapeutisch ist eine komplette und kurative Tumorresektion anzustreben. Bei inkompletter Tumorentfernung kann mehr oder weniger wirksam auf Medikamente zurückgegriffen werden, die eine symptomatische Therapie darstellen (Raue, 1999).

2.4 Molekulargenetische Grundlagen von sporadischen Neuroendokrinen Pankreastumoren (NPTs)

Die Kenntnis über die molekulargenetischen Grundlagen der sporadischen NPTs ist im Gegensatz zu den familiär auftretenden NPTs noch sehr begrenzt. Die vorliegenden genetischen Daten beruhen auf niedrigen Fallzahlen, was mit dem seltenen Auftreten der Tumoren zusammenhängt. In den letzten 5 Jahren wurde die Bedeutung bekannter Onkogene und Tumorsuppressorgene auf die Bildung von NPTs untersucht. Dabei konnten Mutationen des *K-ras*-Onkogens und des *TP53*-Tumorsuppressorgens bei NPTs nur sehr selten nachgewiesen werden, so dass diese Gene bei NPTs keine bedeutende Rolle spielen (Yoshimoto *et al*., 1992; Yashiro *et al*., 1993; Pavelic *et al*., 1996). Ebenso wurden keine genetischen Veränderungen im Retinoblastoma (*RB*)-Tumorsuppressorgen gefunden (Chung *et al*., 1998). Das *MEN1*-Gen auf Chromosom 11q13 hingegen zeigt multiple genetische Veränderungen (Chandrasekharappa *et al*., 1997). Die Region um das *MEN1*-Gen weist einen Verlust von Heterozygotie (LOH) bei 93% der 28 untersuchten sporadischen Gastrinome und 50% der 12 untersuchten sporadischen Insulinome auf (Zhuang *et al*., 1997). Somatische Mutationen im *MEN1*-Gen wurden in 16-42% der sporadischen NPTs nachgewiesen (Zhuang *et al*., 1997; Hessmann *et al*., 1999; Guo *et al.*, 2002). Andere Studien zeigten Allelverluste im telomer gelegenen Bereich vom *MEN1*-Gen (Eubanks *et al.*, 1994; Chakrabarti *et al.*, 1998; Gortz *et al.*, 1999; Rigaud *et al.*, 2001). Perren und seine Mitarbeiter widerlegten den Einfluss der Region 11q23 mit dem nahegelegenen *SDHD* (*succinate*

dehydrogenase subunit D)-Gen, der zunächst von Rigaud, sowie Hirawake und dessen Mitarbeitern angenommen wurde (Hirawake *et al.*, 1999 ; Rigaud *et al.*, 2001; Perren *et al.*, 2002). Bei mehr als der Hälfte der untersuchten Gastrinome wurde eine Amplifikation im *HER-2/neu*-Protoonkogen festgestellt (Evers *et al*., 1994). Alterationen des $p16^{INK4a}$–Tumorsuppressorgen bei 70 bis 90% der sporadischen Gastrinome und nicht-funktionellen NPTs wurden von Muscarella und Kollegen, sowie der Arbeitsgruppe von Bartsch dokumentiert (Bartsch *et al*., 1998; Muscarella *et al*., 1998). Serrano und seine Arbeitsgruppe erhielt bei 52% der 44 untersuchten Gastrinome Alterationen (Serrano *et al.*, 2000). Insulinome mit $p16^{INK4a}$-Veränderungen fanden sich lediglich in 17% der Fälle (Bartsch *et al*., 2000). In der Arbeit von Moore und seiner Arbeitsgruppe zeigte ein Insulinom von 41 untersuchten NPTs eine Alteration (Moore *et al.*, 2001). Von Bartsch und seiner Arbeitsgruppe konnten im Jahr 1999 bei 55% der untersuchten funktionell inaktiven Pankreastumoren Mutationen im *DPC4* (*deleted in pancreatic carcinoma, locus 4*)-Tumorsuppressorgen erkannt werden, während bei den funktionell aktiven NPTs keine *DPC4*-Veränderungen vorlagen (Bartsch *et al.*, 1999). Die Mutationen traten nur bei bereits metastasierten Tumoren auf. Die Gruppe zog aus ihren Ergebnissen die naheliegende Schlussfolgerung, dass *DPC4*-Veränderungen zur Entstehung eines aggressiven Phänotyps bei funktionell inaktiven Pankreastumoren eine wichtige Voraussetzung zu sein scheint. Zwei Jahre später veröffentlichte Moore mit seiner Arbeitsgruppe eine Untersuchung von u.a. 11 funktionellen und 30 nicht-funktionellen endokrinen Pankreastumoren. Er konnte weder Mutationen noch homozygote Deletionen im *DPC4*-Gen feststellen. Die Gruppe erklärte sich ihre Ergebnisse mit der höheren Fallzahl im Vergleich zur Arbeit von Bartsch und seinen Mitarbeitern (Moore *et al.*, 2001). Perren und seine Arbeitsgruppe befassten sich mit der Region um das *PTEN*-Tumorsuppressorgen in der Region 10q23. 8 von 15 informativen (53%) malignen und keiner von 7 benignen Tumoren zeigte LOH. Eine somatische Mutation in Exon 6 von *PTEN* stellte sich allerdings lediglich in einem der malignen Tumoren heraus, so dass nicht von einem wesentlichen Einfluss dieses Gens auf die Pathogenese der NPTs ausgegangen werden kann (Perren *et al.*, 2000).

Eine erste genomweite Alleltypisierung mit Hilfe von Mikrosatellitenanalyse humaner NPTs konnte signifikante LOH-Raten, bei einem relativ niedrigen „fractional allelic loss“ (FAL) von 0.12, auf den Chromosomenabschnitten 3p (35%), 3q (32%), 6q (28%), 11q (30%), 11p (36%), 16p (36%) und 22q (30%) feststellen, was auf dort lokalisierte, potentiell bedeutsame Tumorsuppressorgenloci hinweist (Chung *et al.*,

1998). Eine schwedische Studie belegte wenig später die hohen LOH-Raten auf Chromosom 3p mit 45%, 11q13 mit 55%, 18q mit 27% für sporadische NPTs und mit 36%, 91% und 25% für *MEN1* assoziierte NPTs (Hessmann *et al.*, 1999). Des Weiteren belegte eine Studie von Speel und Mitarbeitern chromosomale Deletionen auf den Chromosomenabschnitten 3p (30%), 6q (39%), 6p (27%) und 11q (36%) in DNA metastasierter NPTs durch Anwendung der „comparative genomic hybridization" (CGH)-Technik (Speel *et al.*, 1999). Eine weitere LOH Studie bei 20 NPTs wurde über ausgesuchte Regionen der Chromosome 3q, 11q, 13q, 18q, 17p und 17q angefertigt (Beghelli *et al.*, 1998). In der gleichen Arbeit zeigten sich zusätzlich jeweils eine Mutation im Bereich der bekannten Tumorsuppressorgen-loci *Ki-ras* und *p53* bei den untersuchten nicht-funktionellen Tumoren. Bemerkenswert ist die Erkenntnis, dass das Auftreten von LOH in der chromosomalen Region von 17p13 positiv korrelierte mit der Malignität und Metastasenbildung der Tumoren und negativ mit dem Vorkommen von Progesteronrezeptoren im Tumor. Allgemein war die Frequenz von Allelverlust bei malignen Tumoren mit 40% höher als bei gutartigen Tumoren mit 17% (Beghelli *et al.*, 1998).

In einer von Stumpf und seinen Mitarbeitern vorgestellten genomweiten „Comperative genomic hybridization" (CGH) zeigten sich die größten Verluste auf 11q mit 32%, 11p mit 24% und 6q mit 20% (Stumpf *et al.*, 2000). Ähnliche Ergebnisse erhielt auch die Arbeitsgruppe um Speel für 11q (36%), 11p (30%) und 6q (39%) (Speel *et al.*, 1999). Durch die LOH-Analyse von nicht-funktionellen PETs in einer Arbeit von Rigaud und seiner Arbeitsgruppe wurden diese hohen Verluste auf 11q und 6q (>60%) bestätigt und sogar übertroffen. Damit wurde ein Unterschied zwischen funktionellen und nicht-funktionellen NPTs unterstrichen. Bei Rigaud und seinen Mitarbeitern wurde weiterhin bei ungefähr 50% der 16 untersuchten Tumoren im Bereich von Chromosom 11p, 20q und 21 ein Verlust von Heterozygotie festgestellt (Rigaud *et al.*, 2001).

Die Arbeit von Stumpf und seiner Arbeitsgruppe wies einen Verlust des X-Chromosoms in 24% der untersuchten 25 funktionellen Tumoren auf (Stumpf *et al.*, 2000). Dieses Phänomen wurde in der Arbeit von Missiaglia und seinen Mitarbeitern erneut untersucht und unter Verwendung der FISH und der LOH-Analyse für ihr Untersuchungsmaterial bestätigt. Der X-Chromosomverlust trat interessanterweise bei 9 von 31 nicht-funktionellen (29%) und 1 von 9 funktionellen Tumoren (11%) auf, was ein unterschiedliches Verhalten von funktionellen und nicht-funktionellen Tumoren vermuten lässt. Insgesamt zeigten 40% der weiblichen Patienten einen X-

Chromosomverlust, der positiv korrelierte mit dem Auftreten von Metastasen, lokal invasivem Wachstum und letztlich geringerer Überlebenszeit. Dagegen bei männlichen Patienten lag ein Verlust des Y-Chromosoms in 36% der Fälle vor und nur selten ein Verlust vom X-Chromosom (Missiaglia *et al.*, 2002). Die Ergebnisse von Missiaglia wurden unterstützt durch die Arbeit von Speel. Speel und seine Arbeitsgruppe stellten einen häufiger auftretenden X-Chromosomverlust in Tumoren von Frauen (38%) im Vergleich zu Tumoren von Männern (7%) fest, wobei 45% der Tumoren von Männern einen Y-Chromosomverlust zeigten. Sowohl Missiaglia als auch Speel stellten häufiger einen „Gain" auf Chromosom X bei Männern fest als bei Frauen (Speel *et al.*, 1999). Zuletzt erhielt Chen und seine Arbeitsgruppe bei der LOH-Analyse von 16 Gastrinomen von Patientinnen ähnliche LOH-Raten (56%) und es war ein signifikanter Zusammenhang, wie auch schon bei Missiaglia und seiner Gruppe, zwischen LOH auf dem X-Chromosom und aggressivem postoperativem Tumorwachstum und der initialen Tumorgröße zu erkennen (Chen *et al.*, 2004).

1999 wurde eine LOH-Studie von Chromosom 1 bei 29 NPTs (3 der Tumoren waren mit *MEN1* assoziiert) durchgeführt, wobei 10 von 29 informativen Tumoren (34%) einen Verlust eines Allels zeigten. In dieser Studie korrelierte die häufige LOH-Rate mit dem Auftreten von Lebermetastasen (7/8 zu 3/21 bei nicht metastasierten Tumoren) (Ebrahimi *et al.*, 1999). Durch eine weitere Studie bei der 12 Mikrosatellitenmarker in verschiedenen Regionen von Chromosom 1 eingesetzt wurden, wurde das gehäufte Vorkommen von LOH bei NPTs mit Lebermetastasen bestätigt (7/8 im Vergleich zu 3/18 LOH bei Tumoren ohne Lebermetastasen), wobei bei 3 Tumoren außerdem eine Mutation des *MEN1*-Gens vorlag (Guo *et al.*, 2002). Letztendlich konnte somit der Verdacht auf einen neuen Tumorsuppressorgen-locus auf Chromosom 1 erhärtet werden.

Sporadische NPTs zeigten eine 33%-Rate des Verlustes der Heterozygotie (LOH) auf dem Chromosomenabschnitt 3p25 (Chung *et al.*, 1997). Dabei handelte es sich fast ausschließlich um maligne NPTs, weshalb die Autoren den Bereich 3p14-25 als Marker zur Unterscheidung von benignen und malignen NPTs vorschlugen. Das in dieser Region lokalisierte *VHL* (Von Hippel-Lindau (Syndrom))-Tumorsuppressorgen zeigte hingegen keinerlei Mutationen, die den Grund des hohen Allelverlustes erklärten. Als eine Fortführung der Arbeit von Chung und seinen Mitarbeitern von 1997 kann man die Arbeit von Nikiforova und ihrer Arbeitsgruppe ansehen (Chung *et al.*, 1997; Nikiforova *et al.*, 1999). Nikiforova bestätigte bei 21 Patienten eine hohe LOH-Rate auf 3p (13/21;

62%), sowie die fehlende Bedeutung des *VHL*-Gens bei der Tumorgenese (2/9 Tumoren zeigten Deletionen). Dagegen zeigten sich in hoher Frequenz Allelverluste im Bereich von 3p14.2-p21 (8/15; 53%), was auf die Lokalisation eines relevanten Tumorsuppressorgens hinweisen könnte (Nikiforova *et al.*, 1999). Die aktuellsten LOH-Studien auf Chromosom 3 wurden von der Arbeitsgruppe um Guo erstellt. Eine „Hot Spot"-Region mit möglicher Lokalisation eines Tumorsuppressorgens stellt danach scheinbar die Sequenz 3q27-qter dar, die bei NPTs mit vorhandenen Lebermetastasen in 50% der Fälle LOH (4/8) und bei NPTs ohne Lebermetastasen in keinem von 8 Fällen ein LOH beinhaltet (Guo *et al.*, 2002). Die Aussagekraft dieser von Guo erlangten Ergebnisse ist aufgrund der niedrigen Fallzahlen allerdings sehr eingeschränkt.

Chromosom 6q wies in mehreren Arbeiten unter Anwendung verschiedener Untersuchungstechniken (Allotyping, *FISH*, *CGH* (*Comparative genomic tumors*)-Technik) sogenannte „Hot Spot"-Regionen auf, die mutmaßliche Tumorsuppressorgen-Regionen darstellen (Speel *et al.*, 1999; 6q15-q22: Stumpf *et al.*, 2000; 6q13 bis 6q25-q27: Barghorn *et al.*, 2001; Rigaud *et al.*, 2001). Ein besonders gehäuftes Auftreten von Allelverlusten auf 6q zeigte sich interessanterweise bei den nicht-funktionellen NPTs, was allerdings bislang durch keine andere Arbeit bestätigt werden konnte (Rigaud *et al.*, 2001).

In der zuvor beschriebenen Arbeit von Chung und seiner Arbeitsgruppe zeigten im Bereich von Chromosom 6q lediglich 1 von 21 funktionellen NPTs und 4 von 7 nicht-funktionellen NPTs LOH (Chung *et al*, 1998).

Drei Arbeiten unserer Arbeitsgruppe beschäftigten sich mit LOH-Analysen von Chromosom 22q in Insulinomen, bzw. NPTs (Wild *et al.*, 2001, 2002, 2003). Obwohl sich in der Region 22q12.3 eine LOH-Rate von über 50% ergab, konnte eine Mutationsanalyse des *hSNF5/INI1*-Gens, welches auf 22q12.3 lokalisiert ist, keine relevanten Mutationen in den 15 Insulinomen aufdecken. Dementsprechend scheint dieses potentielle Tumorsuppressorgen für Insulinome keine Rolle zu spielen (Wild *et al.*, 2001). In der Folgearbeit wurden 23 Patienten mit NPTs untersucht. Regionen gesteigerter Verluste von Heterozygotie liessen die Lokalisation anderer potentieller Tumorsuppressorgene vermuten, woraufhin besonders 22q12.1 und 22q12.3 als mutmaßliche Tumorsuppressorgen-loci für NPTs vorgeschlagen wurden (Wild *et al.*, 2001, 2002). In der chromosomalen Region 22q12.3 befindet sich das potentielle Tumorsuppressorgen *TIMP-3* („tissue inhibitor of metalloproteinase-3"), welches in eingehender molekularer Analyse bei 13 von 21 Tumoren alternativ aktiviert war.

Damit spielt *TIMP-3* möglicherweise eine Rolle in der Tumorgenese, bzw. Metastasierung von NPTs, Alterationen bei bereits metastasierten Tumoren (11 von 14 Tumoren) deutlich häufiger auftraten als bei NPTs ohne Metastasen (1/7) (Wild *et al.*, 2003).

Insgesamt wurden also mehrere Chromosomen, mehr oder minder intensiv auf ihren Einfluss in der Tumorgenese von NPTs hin untersucht und auch einige mögliche Tumorsuppressorgenregionen ausfindig gemacht (Tab. 2). Dennoch ist bislang kein einzelnes Tumorsuppressorgen, bzw. die Veränderung desselben eindeutig für die Entstehung von NPTs verantwortlich zu machen. In dieser Arbeit wurde deshalb ein besonderer Augenmerk auf das Chromosom 11p gelegt. In der Arbeit von Chung und seinen Mitarbeitern wurde bereits 1997 über eine auffallend hohe LOH-Rate bei NPTs auf Chromosom 11p berichtet. Deshalb wurde im Folgenden mit 12 Mikrosatellitenmarkern, die die Untersuchung unterschiedlicher Sequenzabschnitte von Chromosom 11p erstmals in Form eines Fine-Deletion Mapping zuliessen, eine Studie an DNA von 29 NPTs durchgeführt (Chung *et al.*, 1997).

Tabelle 2: **Veröffentlichungen über Molekulargenetische Untersuchungen von NPTs**

1. Teil

Gene/ Chromosom/ Chromosomenabschnitt	Methode	NPT	Veränderungen (%)	Referenz
K-ras	somatische Mutationen	Ins, Gas, NPT,Vip	selten	Yoshimoto et al., 1992;
			selten	Yashiro et al., 1993;
		benigne Ins	25	Pavelic et al., 1996;
		maligne Ins	67	
		NPT	selten	Ebert et al., 1998; Moore et al., 2001
p53	somatische Mutationen	Ins, Gas,	selten	Yoshimoto et al., 1992;
		NPT,Vip		Beghelli et al., 1998; Lam et al., 1998; Moore et al., 2001
Retinoblastom(RB)-Gen	LOH	NPT	0	Chung et al., 1998
MEN 1	LOH und somatische Mutationen	MEN1, NPTs, Gas, Ins	28-69 (93) 16-42	Eubanks et al., 1994; Chandrasekharappa et al., 1997; Zhuang et al., 1997; Chakrabarti et al., 1998; Gortz et al., 1999; Hessman et al., 1999; Rigaud et al., 2001; Guo et al., 2002
SDHD	somatische Mutationen und LOH	NPT	selten	Hirawake et al., 1999; Rigaud et al., 2001; Perren et al., 2002;
HER-2/neu	Gen-Amplifikation	Gas	50	Evers et al., 1994

2. Teil

Gene/ Chromosom/ Chromosomenabschnitt	Methode	NPT	Veränderungen (%)	Referenz
$p16^{INK4a}$	Hypermethylation,	Gas, NPT,	52-90	Muscarella et al., 1998;
	homozygote Deletion	Ins	17	Serrano et al., 2000; Bartsch et al., 2000;
	somatische Mutation	NPT	2,4	Moore et al., 2001
PTEN	somatische Mutationen LOH	maligne NPT	6,67 53	Perren et al., 2000
TIMP3	somatische Mutationen	NPT	79	Wild et al., 2003
Chromosom X/Y	CGH	funkt./ nicht-funkt. NPTs	45(Y), 25 (X) 24 36(Y), 40(X)	Speel et al., 1999; Stumpf et al., 2000; Missiaglia et al., 2002;
	LOH	Gas	56(X)	Chen et al., 2004
Chromosom 1	LOH	Ins, Gas, NPTs	34-38	Ebrahimi et al., 1999; Barghorn et al., 2001; Guo et al., 2002
Chromosom 3	LOH	Ins, Gas, NPT, Maligne und benigne PETs	25-62	Chung et al., 1997; Beghelli et al., 1998; Hessman et al., 1999; Nikiforova et al., 1999; Guo et al., 2002
Chromosom 6	LOH	Ins, Gas, NPT,	selten – 60	Chung et al, 1998; Rigaud et al., 2001
	CGH	NPT	20	Stumpf et al., 2000;
Chromosom 10	LOH	maligne PET, benigne PET	53 0	Perren et al., 2000
Chromosom 11	LOH/ CGH	Ins, Gas, NPT	24-63	Beghelli et al., 1998; Chung et al., 1998; Hessman et al., 1999; Stumpf et al., 2000; Rigaud et al., 2001
Chromosom 13	LOH	NPT	15	Beghelli et al., 1998
Chromosom 16	LOH	Ins, Gas, NPT	27	Chung et al., 1998
Chromosom 17	LOH	NPT	35	Beghelli et al., 1998
Chromosom 18	LOH	NPT	35	Beghelli et al., 1998; Hessman et al., 1999
Chromosom 22	LOH	Ins, Gas, NPT	30-59	Chung et al., 1998; Rigaud et al., 2001; Wild et al.; 2001, 2002, 2003

Ins = Insulinome, Gas = Gastrinome, NPT = Neuroendokrine Pankreastumoren, PET = Pancreatic endocrine tumors

2.5 Molekulargenetische Grundlagen von 11p

In mehreren Studien wurde ein Einfluss von 11p auf die Tumorgenese bei zahlreichen Tumorentitäten, z.B. Mamma-, Bronchial-, Hoden-, Ovarial-, Harnblasen- und Schilddrüsenkarzinome (Beispiele in Tab. 3) angenommen. Allerdings ist das Chromosom 11p bei NPTs bisher kaum untersucht. Einige wenige Arbeiten schlossen bei genomweiten Alleltypisierungen Chromosom 11p in ihre Untersuchungen mit ein.

Chung und seine Arbeitsgruppe fanden LOH auf Chromosom 11p bei 28 NPTs, wobei sie folgende Ergebnisse erhielten: D11S554 30% (8/27) LOH, WT1 31% (5/16), D11S995 35% (9/26), D11S1324 31% (8/16) und D11S921 19% (3/16) (Chung *et al.*, 1998). In einer von Stumpf und seinen Mitarbeitern vorgestellten genomweiten „Comperative genomic

hybridization“ (CGH) zeigten sich Verluste auf Chromosomabschnitt 11p13-p15 mit 24% (6/25) (Stumpf *et al.*, 2000). Ähnliche Ergebnisse erhielt auch die Arbeitsgruppe um Speel für 11p (30%) bei 44 endokrinen Pankreastumoren (Speel *et al.*, 1999). Rigaud und seine Arbeitsgruppe stellten bei der genomweiten Mikrosatellitenanalyse einen Verlust von von 14 bis 57% im Bereich von Chromosom 11p fest, wobei 7 unterschiedliche Mikrosatellitenmarker eingesetzt wurden (Rigaud *et al.*, 2001). Weiterhin veröffentlichten Hessman und seine Arbeitsgruppe 2001 eine genomweite LOH-Studie bei *MEN1* assoziierten Tumoren und fanden nicht nur in Regionen um das *MEN1*-Gen (11q13) auf Chromosom 11q 92% LOH, sondern auch auf Chromosom 11p 94% (Hessman *et al.*, 2001).

Insgesamt fällt die besondere Bedeutung der DNA-Sequenzen von *WT1* und *WT2* auf. Nahezu bei allen beispielhaft beschriebenen Tumorentitäten stellte sich eine häufige DNA-Veränderung in diesen Genabschnitten heraus (Tab 3). Auch in dieser Arbeit wurde deshalb, nach der Chromosomenarm weiten LOH-Analyse, eine genaue Betrachtung des *WT1*-Genlokus 11p13 angeschlossen. Exon 7, 8 und 9 des Wilmstumorgen wurden in molekulargenetischen Arbeiten bis heute als Orte erhöhter Veränderungsraten („Hot Spots“) gesehen (Gerald *et al.*, 1995; Jeanpierre *et al.*, 1998; Patek *et al.*, 1999).

Tabelle 3: **Molekulargenetische Untersuchungen auf Chromosom 11p in bisher veröffentlichten Arbeiten**

1. Teil

Tumorart	Publikationen	Position	Marker	Informative Tumoren	LOH auf 11p13 (%)	beide (%)	LOH auf 11p15 /bzw 11p15.5 (%)
Mammakarzinom	Andersen et al., 1992	11p15.5	c-Hras	30	-		10
sporadische	Nakata et al., 1998		D11S922	131	-		38
Mammakarzinome			D11S1318	96	-		39
			D11S1338	105	-		36
			D11S1349	115	-		37
			D11S1324	121	-		29
Ovarialtumoren	Viel et al., 1992	11p15.5	Hras1	19	-		47
		11p15.5	IGF2	14	-		43
		11p15.5	Insulin	20	-		35
		11p15.5	D11S12	4	-		50
		11p15.5	ß-Globulin	16	-		25
		11p15.5	A-Globulin	13	-		15
		11p15.5	G-Globulin	14	-		36
		11p15.4	Calcitonin	15	-		40
		11p13	D11S17	17	35		
		11p13	ß-FSH	24	29		
		11p13	D11S16	23	26		
		11p13	Catalase	24	25		

2. Teil

Tumorart	Publikationen	Position	Marker	Informative Tumoren	LOH auf 11p13 (%)	beide (%)	LOH auf 11p15 /bzw 11p15.5 (%)
Hodentumor	Smith et al., 1995		insg.	17	47		
			insg.	26	-		50
nicht kleinzellige	Fong et al., 1994	11p15.5	Hras	47	-		15
Bronchialtumoren		11p15.5	INS	33	-		36
		11p15.4-p15.5	RRM1	42		17	
		11p13	FSHB	46	20		
		11p13	WT1	52	10		
		11p13	CAT	40	15		
nicht kleinzellige	Sanchez-Cespedes et	11p15.5	Hras	34	-		32
Bronchialtumoren	al.,		D11S860	44	-		20
	1997		insg.	61	-		31
		11p13-p14.3	D11S904	63	19		
anaplastische Schilddrüsen-karzinome	Kitamura et al., 2000	11p15	D11S922	15	-		33
follikuläre Schilddrüsen-karzinome	Kitamura et al., 2001	11p15	D11S922	43	-		28
Hals-, Nacken-squamöse Tumoren	El-Naggar et al., 1996	11p15.5	THO1	49	-		40.8
			HBE1		-		
		11p15.1-p15.5	D11S988		-		
			D11S875		-		
		11p13	D11S995	41	29.3		
		11p13-p14	D11S989				
		11p11-p12	D11S436	48		18.8	
			D11S554				
Hals-, Nackentumoren	Miracca et al., 2000	11p15	D11S860	45	-		27
Medulloblastome	Yin et al., 2001	11p15.5	D11S922	9	-		22
			D11S1318	10	-		10
			D11S988	14	-		43
		11p15.4	D11S926	10		40	
		11p15.1	D11S899	9		22	
		11p15.1-p14.1	D11S915	12		50	
		11p14-p13	D11S904	6		17	
		11p13	D11S907	10	40		
			D11S1392	11	0		
			D11S871	7	28.6		
		11p13-q13	D11S903	8		25	
kindliche Medulloblastome	Lescop et al., 1999	11p15.5	Hras	12	-		17
			D11S922	18	-		11
			TH	21	-		9.5
			D11S1318	16	-		19
			D11S860	14	-		7
			D11S988	14	-		21
			D11S1338	17	-		12
		11p14	D11S929	19	9	10.5	
		11p13	WT1	11			
		11p12	D11S905	17		12	

3. Teil

Tumorart	Publikationen	Position	Marker	Informative Tumoren	LOH auf 11p13 (%)	beide (%)	LOH auf 11p15 /bzw 11p15.5 (%)
Harnblasentumoren	Shaw et al., 1995	11p15.5	Hras	100 (insg)		30 (insg)	
			D11S922				
			TH				
		11p15.1-p15.2	D11S569				
		11p13-p14.3	D11S861				
			D11S904				
		11p13	WT1				
			CAT				
		11p11.2-p12	D11S554				
Kolorektale Tumoren	Massa et al., 1999	11p15.5	Hras			4.1	
		11p14-p13	D11S904	73			
Rhabdoid Tumoren der Nieren	Schofield et al., 1996	11p15.5	Hras				
			TH				
			D11S860				
			HBB				
Pankreatoblastome	Abraham et al., 2001	11p15.5-p15	TH				
		11p15.5	D11S1984				
dysplastische vs. hepatozelluläre Karzinome	Kahng et al., 2003	11p13	D11S989	3 bzw 8	0/25		
			D11S995	9 bzw 12	33/8		
			D11S907	14 bzw 9	7/44		
Tumor der Vater´schen Papille	Moore et al., 2004	11p	18 verschied. Mikrosatel-litenm.	8		z.T. > 50	

Hier sind bisher veröffentlichte LOH-Studien auf 11p aufgeführt. Es wurden die verwendeten Mikrosatellitenmarker genannt, sowie soweit bekannt die LOH-Rate der jeweils informativen Tumor DNA, separat für die jeweilige Region des Markers.

3. Ziel der Arbeit

Die seltenen neuroendokrinen Pankreastumoren (NPTs) sind eine heterogene Gruppe von hormonaktiven, benignen oder malignen Tumoren. NPTs bedrohen das Leben der Patienten sowohl durch ihre gesteigerte Hormonproduktion, als auch durch ihr malignes Wachstum. Die genetischen Veränderungen, die zur Entstehung und Progression der NPTs beitragen, sind immer noch weitgehend unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es deshalb erstmals ein Fine-Deletion-Mapping von Chromosom 11p durchzugeführen, um durch die detaillierte Analyse des Verlustes der Heterozygosität (LOH) mögliche Lokalisationen potentieller Tumorsuppressorgene, die an der Entstehung von NPTs beteiligt sind, aufzudecken. Potentielle Kandidatengene sollen direkt durch Mutationsanalyse untersucht werden. Durch Auswertung der erhobenen klinisch-genetischen Daten soll die diagnostische und prognostische Wertigkeit potentieller genetischer Marker bestimmt werden. Die Arbeit soll neue Erkenntnisse bringen, die ein besseres Verständnis der Tumorgenese und Progression der NPTs ermöglichen. Idealerweise wäre ein neuer Tumorsuppressorgenlokus eingrenzbar.

4. Material und Methoden

4.1 Patienten und Gewebeproben

Für die Studie stand Tumorgewebe und Blut von 29 Patienten mit NPTs aus der Tumorbank der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Philipps-Universität Marburg zur Verfügung. Die klinischen Charakteristika gehen aus der Tabelle 4 hervor.

Die Einteilung der Tumoren erfolgte, wie im Kapitel „Neuroendokrine Pankreastumoren“ beschrieben, nach funktionellen, histologischen und anamnestischen Gesichtspunkten. Von 29 NPTs waren 11 Insulinome, 6 Gastrinomen, 2 Vipomen und 1 Reninom, sowie 9 nicht-funktionelle neuroendokrine Tumoren vertreten. Alle Patienten haben ihre schriftliche Einwilligung in die Studie gegeben und ein positives Votum der Ethikkommission der Philipps-Universität-Marburg lag vor.

Tabelle 4: **Klinische Daten der 29 NPT Patienten, bei denen ein Allelotyping von Chromosom 11p durchgeführt wurde**

1. Teil					
Patient	**Alter bei Operation (Jahre)**	**Tumorart**	**Malignitätszeichen**	**Primärtumor Größe (mm)**	**Nachuntersuchung (Monate)**
101/98	53	Insulinom	Keine	10x15	33; NED
117/97	79	Insulinom	Keine	10x10	30; NED
90	45	Insulinom	Keine	30x30	31; NED
117	49	Insulinom	Keine	15x22	19; NED
187/98	33	Insulinom	Keine	8x3	141; NED
26/96	56	Insulinom	Keine	18x14x14	48; NED
85/96	51	Insulinom	Keine	20x20	37; NED
163/98	62	Insulinom	IG	35x18	16; NED
F11	48	Insulinom/MEN1	Keine	40x30x20	82; NED
79/97	52	Insulinom	IG	25x22	38; NED
168/98	64	Insulinom	LN metastasen	80x60	130; AWD
167/98	50	Gastrinom	Keine	20x20	103; NED
177/98	57	Gastrinom	Keine	9x30x5	75; NED
164/98	58	Gastrinom	LN metastasen	5x6	73; NED
141/98	28	Gastrinom	LN metastasen	20x20	35; NED
F8ZR	32	Gastrinom/MEN1	LN metastasen	20x20	40; AWD
74/96	56	Gastrinom	Lebermetastasen	25x25	2; DOD
PJ	32	Vipom/MEN1	Lebermetastasen	n.b.	112; AWD

2. Teil					
Patient	**Alter bei Operation (Jahre)**	**Tumorart**	**Malignitätszeichen**	**Primärtumor Größe (mm)**	**Nachuntersuchung (Monate)**
20/96	50	Vipom	Lebermetastasen	20x20	47; AWD
122	44	Reninom	Lebermetastasen	100x50x30	12; DOD
53/96	61	Nicht-funktionell	IG	35x35	42; NED
91	64	Nicht-funktionell	LN metastasen	35x35	30; NED
155/98	63	Nicht-funktionell	LN metastasen	100x100	Nicht erhalten
106	45	Nicht-funktionell	LN metastasen	70x80x50	49; AWD
108	62	Nicht-funktionell	Lebermetastasen	30x16	21; DOD
166/98	43	Nicht-funktionell	Lebermetastasen	26x26	168; NED
172/98	50	Nicht-funktionell	Lebermetastasen	31x31	64; AWD
179/98	53	Nicht-funktionell	Lebermetastasen	40x40	114; AWD
162/98	49	Nicht-funktionell	Lebermetastasen	200x200	82; AWD

LN, Lymphknoten; IG, infiltrating overgrowth = infiltratives Wachstum; NED, no evidence of disease = keine Anzeichen von Erkrankung, nach bis zu 3 Nachoperationen; AWD, alive with disease = mit Erkrankung lebend; DOD, dead of disease = durch die Erkrankung verstorben, n.b. = nicht bekannt

4.2 Gewinnung von DNA

4.2.1 Blut DNA Extraktion mit dem QIAamp Tissue Kit (Qiagen)

(abgewandelt nach Angaben des Herstellers)

Vom Patienten wurde venöses Blut in ein EDTA Blut-Röhrchen abgenommen, dass der Verhinderung der Gerinnung dient. Von diesem Blut wurden 200 µl zur DNA-Extraktion mit 25 µl Proteinase K und 200 µl AL-Puffer versetzt. Das entstandene Gemisch wurde für 15 sec gründlich geschüttelt und anschließend für 10 min bei 70°C im Heizblock inkubiert. Danach wurden 210 µl 96-100% Ethanol beigefügt und erneut geschüttelt. Die nun vorliegende Mischung wurde auf eine mitgelieferte Säule gegeben und für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurde die Säule auf ein neues Gefäss gesetzt und 500 µl AW-Puffer hinzu pipettiert. Wieder erfolgte eine 1 minütige Zentrifugation bei 8000 rpm, die Positionierung der Säule auf ein neues Gefäss und die Zugabe von 500 µl AW-Puffer. Nun folgte eine 3 minütige Zentrifugation bei maximaler Umdrehung. Das Gemisch in der Säule wurde auf ein neues Gefäss gegeben und 200 µl auf 70°C aufgewärmtem AE-Puffer zur Elution hinzugegeben. Es wurde anschließend für 1 min bei Raumtemperatur im Heizblock inkubiert. Zuletzt wurde für 1

min nochmals bei 8000 rpm zentrifugiert, um ein Absetzen der DNA auf dem Grund des Gefässes und damit die DNA Gewinnung aus der Lösung zu erleichtern.

4.2.2 DNA Extraktion aus Vollblut

Zur DNA-Extraktion wurden zunächst 1 ml EDTA-Vollblut mit 3 ml auf 4°C gekühltem RCLB-Puffer versetzt und nach zweimaligem Vortexen für 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde per Kühlzentrifuge bei 4°C für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das übrige Gemisch mit 3 ml RCLB-Puffer gewaschen. Erneut wurde bei 4°C für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der entstandene Zellniederschlag wurde in 500 µl SE-Puffer resuspendiert und dann mit 2,5 µl Proteinase K und 25 µl 10% SDS versehen. Über 3 Stunden wurde die Mischung unter langsamem Schütteln bei 55°C im Wasserbad aufbewahrt. Im folgenden Schritt wurden 500 µl SE-Puffer zugefügt und eine weitere Inkubation für 20 min bei 55°C angeschlossen. 300 µl 5 M NaCl wurden anschließend beigegeben. Bei Raumtemperatur erfolgte eine 15 minütige Zentrifugation bei 3000 rpm. Nun wurde der Überstand in ein neues Gefäss gegeben und vorsichtig mit 3 ml 100% Ethanol mit einer Temperatur von –20°C überschichtet. Der sich bildende DNA-Faden wurde mit einer Pipettenspitze entnommen und sogleich mit 3 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Die DNA wurde daraufhin in 100 µl TE-Puffer über Nacht bei 4°C im Schüttler gelöst.

Nach Lösung des DNA-Fadens konnte der DNA-Gehalt mit Hilfe eines Photometers gemessen werden.

4.2.3 Gewebe DNA-Extraktion mit dem QIAamp Tissue Kit (Qiagen)

Nach Tumorresektion wurden 25 mg des Tumorgewebes entnommen und schockgefroren. Anschließend erfolgte eine Mikrodissektion anhand von HE gefärbten Gefrierschnitten zur DNA-Gewinnung. Alle NPTs, die zur DNA-Extraktion verwendet wurden hatten nach Mikrodissektion eine neoplastische Zellularität von mindestens 90%.

Dem mikrosdissozierten Gewebe wurden 180 µl ATL Puffer und 20 µl Proteinase K zugefügt, so dass ein Tumorgemisch entstand, welches nach gründlichem Vortexen über Nacht bei 55°C im Heizblock inkubiert werden konnte. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben jeweils mit 200 µl AL Puffer versehen und bei 70°C für 10 min

inkubiert. Anschließend wurden 210 µl 96-100% Ethanol hinzugefügt. Die entstandene Mixtur wurde auf eine Säule gegeben und für 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Daraufhin wurden 500 µl AW-Puffer zugesetzt und erneut bei 8000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, wobei dieses Mal eine 3 minütige Zentrifugation bei maximaler Umdrehung folgte. Hiernach wurde die Säule auf ein neues Cup gesetzt und mit auf 70°C vorgewärmten 200 µl AE Puffer versehen. Diese Mixtur wurde eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und danach eine weitere Minute bei 8000 rpm erneut zentrifugiert. Die Konzentration der DNA der jeweiligen Probe konnte mit einem Photometer gemessen und entsprechend unter Verwendung von TE-Puffer auf 10 ng/µl verdünnt werden.

4.2.4 Aufreinigung einer DNA-Probe/ Proteinase K-Verdau

Die aufzureinigende DNA-Probe wurde zunächst in 2 ml Gefäße überführt und mit 250 µl SE-Puffer, 3,5 µl Proteinase K, sowie 35 µl 10% SDS für 1 Stunde bei 55°C im Heizblock inkubiert. Bei der folgenden Phenolextraktion wurden 200 µl Phenol und 200 µl Chloroform/ Isoamylalkohol (24:1) zugesetzt. Die Mischung wurde nach dem Vortexen für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die entstehende helle, wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Gefäße gegeben und daraufhin mit ca. 40 µl NaAc (3 M) und 1200 µl 100% Ethanol versetzt. Nach einer gründlichen Durchmischung wurde bei –20°C für 30 min gefällt. Der sich bildende Überstand wurde abpipettiert und der Zellniederschlag unter Zugabe von 1200 µl 70% Ethanol, gevortext und damit gewaschen. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur für 5 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und der Zellniederschlag nun für 3 min in der SpeedVac getrocknet. Anschließend konnte nach Lösung in 75 µl 1 x TE-Puffer die Konzentration der DNA in der Probe mittels Photometer gemessen bestimmt werden.

4.3 Mikrosatellitenanalyse

4.3.1 Auswahl geeigneter Mikrosatellitenmarker

Vorraussetzung für eine genomweite Suche nach potentiellen Tumorsuppressorloci im Bereich von nicht-kodierenden Abschnitten der DNA (*Introns*, zwischen Genen) ist die Auswahl geeigneter hochinformativer Mikrosatellitenmarker. Nach ausführlicher Datenbankrecherche (u.a. GDB, NCBI, OMIM) im Hinblick auf interessante

Tumorsuppressorgene (z.B. *WT1-Gen*), die im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren stehen, zusammen mit einer intensiven Auswertung der relevanten Literatur, gelang die Erstellung einer Liste von 11 informativen Markern für eine 11p chromosomweite Alleltypisierung (Tab. 5).

Tabelle 5: **Ausgewählte Mikrosatelliten**

1. Teil

Amplimer	**D11S921**	**Sequenz-for**	TGCATTCAACAAATCAACA
Lokalisation	11p15.1	**Sequenz-rev**	CTTGGACCATTTAATCTAAAGTAAT
Primer	AFM212xa11a/m	**Produktgrösse**	243-255
Amplimer	**D11S930**	**Sequenz-for**	AAAGAGATTGTGGATATGGC
Lokalisation	11p15-p13	**Sequenz-rev**	GTTTTCTGACACTGCTTCCT
Primer	AFM238xe5a/m	**Produktgrösse**	225-237
Amplimer	**D11S1324**	**Sequenz-for**	CCCCTCACCCTAAAAACTTG
Lokalisation	11p14	**Sequenz-rev**	GGCACAAGGGGAACTTAACT
Primer	AFM079zd3a/m	**Produktgrösse**	119
Amplimer	**D11S907**	**Sequenz-for**	GCTTATTGTCCATACCCAAA
Lokalisation	11p13-p13	**Sequenz-rev**	AAAGTACCTTAATTTCAGGC
Primer	AFM109yala/m	**Produktgrösse**	163-173
Amplimer	**D11S1392**	**Sequenz-for**	TTGCATCCATACGGAAAGTC
Lokalisation	11p13-p13	**Sequenz-rev**	ACATCTGAGACTTGTAGTAGAAGGC
Primer	CHLC.GATA6B09	**Produktgrösse**	201 bp
Amplimer	**D11S995**	**Sequenz-for**	GATTTTCCCACATCTATAATTATA
Lokalisation	11p13-p13	**Sequenz-rev**	CTCTCAGAAACTGAACCAA
Primer	591-1A/1B	**Produktgrösse**	123-139 bp
Amplimer	**WT1**	**Sequenz-for**	TGTGTGAACTGCTTTCAAGTCTGAC
Lokalisation	11p11-p13	**Sequenz-rev**	TTTCCAGGTTAGCAGCCTGGCTGA
Primer	WT1a/b	**Produktgrösse**	498 bp
Amplimer	**D11S4200**	**Sequenz-for**	TTTGTGTTATTATTTCAGGTGC
Lokalisation	11pter-11qter	**Sequenz-rev**	GTTTTTTGTTTCAGTTTAGGAAC
Primer	AFMa081tq5a/m	**Produktgrösse**	109 bp
Amplimer	**D11S4148**	**Sequenz-for**	AGCTTAGACGACAGAGTGAGAC
Lokalisation	11pter-11qter	**Sequenz-rev**	AGCGTACTTACTCCCATTTC
Primer	AFMb076xfla/m	**Produktgrösse**	357 bp
Amplimer	**D11S554**	**Sequenz-for**	GGTAGCAGAGCAAGACTGTC
Lokalisation	11p12-p11.2	**Sequenz-rev**	CACCTTCATCCTAAGGCAGC
Primer	38811-A/-B	**Produktgrösse**	174-254 bp

2. Teil

Amplimer	**D11S1361**	**Sequenz-for**	ATCTCAATGCCTGTTAGGATTACC
Lokalisation	11p12-p11	**Sequenz-rev**	AGTCAATTTCATGCTCTCTGGAAG
Primer	AFMa131xd5a/m	**Produktgrösse**	208 bp
Amplimer	**D11S1985**	**Sequenz-for**	GTGGAGCTTCGTTGAGAGAG
Lokalisation	11pter-11q13.5	**Sequenz-rev**	GACTCAGATGGTAGAGGTAG
Primer	nicht bekannt	**Produktgrösse**	310 bp

Sequenz-for = Sequenz-forward (Vorwärtssequenz),
Sequenz-rev = Sequenz-reverse (Rückwärtssequenz)

So konnte erstmals ein sogenanntes Fine-Deletion-Mapping durchgeführt werden, indem 11 Mikrosatellitenmarker in folgenden Abständen über das Chromosom verteilt zur LOH-Analyse eingesetzt wurden.

Tabelle 6: Position und Distanzen zwischen den ausgewählten Mikrosatellitenmarkern

Von Marker bis Marker (telomer – zentromer)	Position	Distanz
D11S921 bis D11S930	17.248.741 bis 26.259.702	9.010.962 bp
D11S930 bis D11S1324	26.259.470 bis 288.782.287	2.618.817 bp
D11S1324 bis D11S907	28.878.162 bis 34.632.000	5.753.839 bp
D11S907 bis D11S1392	34.604.386 bis 34.632.000	27.614 bp
D11S1392 bis D11S4200	34.604.386 bis 34.816.985	212.599 bp
D11S4200 bis D11S4148	34.816.853 bis 39.144.331	4.327.478 bp
D11S4148 bis D11S554	39.144.150 bis 44.894.773	5.750.624 bp
D11S554 bis D11S1361	44.894.570 bis 44.910.110	15.540 bp
D11S1361 bis D11S1985	44.909.903 bis 58.271.743	13.361.841 bp

Quelle: Sanger-Institut

Anmerkung: Der verwendete Marker D11S995 war nicht lokalisiert.

Diese Liste berücksichtigt außerdem bereits für NPTs beschriebene hohe LOH-Raten aus Arbeiten der letzten Jahre. Die Auswahl ergab sich mit Rücksicht auf Ergebnisse der jeweiligen Alleltypisierung, d.h. fanden sich hohe LOH-Raten bei anfänglich untersuchten Markern (D11S995; D11S1392; D11S907), wurde bei der Wahl weiterer Mikrosatellitenmarker die Region weiter eingegrenzt. Die nähere Eingrenzung der LOH-Loci ist auf diesem Wege durchführbar und führt eventuell bis hin zu einer Identifizierung möglicher Kandidatengenorte.

4.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

(Mullis *et al.*, 1986; Newton und Graham, 1994)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine *in-vitro* Technik, mit der gezielt Desoxyribonukleinsäure-(DNA-)Abschnitte, die von zwei bekannten Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigt werden können. Unter optimalen Bedingungen kann eine exponentielle Anhäufung des Amplikats auf bis zu 10^7fach erfolgen. Das Enzym, DNA-Polymerase benötigt zur Erstellung eines DNA-Duplikats (Amplikon) eine kurze doppelsträngige Startersequenz (Primer), die durch die Anlagerung kurzer synthetischer Oligonukleotide bereitgestellt wird. Des Weiteren werden zur Erstellung der neu zu synthetisierenden DNA Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs) und eine definierte Zusammensetzung an Salzionen (Mg^{2+}) im Reaktionspuffer hinzugefügt.

Die Verwendung einer hitzestabilen Taq DNA-Polymerase, die ein Temperaturoptimum von über 70°C besitzt und die für kurze Zeit auch bei Temperaturen von bis zu 95°C stabil ist, dient zur Polymerisierung des neuen DNA-Doppelstranges und ermöglicht die wiederholte Hitzedenaturierung zu einzelsträngigen DNA-Matrizen, ohne dass das Enzym inaktiviert wird.

Tabelle 7: **Beispiel eines 10 µl Ansatzes**

		oder
$Primer_{forward}$	0,4µl	0,4µl
$Primer_{reverse}$	0,4µl	0,4µl
dNTP	0,8µl	0,8µl
(1x, 1,25x, 1,5x) $MgCl_2$-Puffer	1µl	-
Taq	0,1µl	0,1µl
H_2O	5,8µl	6,1µl
DMSO	0,5µl	-
DNA	1µl	1µl
12er (KCl) Puffer	-	1µl
Mastermix	-	0,2µl

Der Unterschied der beiden Ansätze liegt in der eingesetzten Salzionen-Konzentration, wobei ein Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)-oder ein Kaliumchlorid (KCl)-haltiger Puffer (hier sog. 12er-Puffer) verwendet wurde.

4.3.3 Verwendete Agentien für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Im Folgenden sind die Optimierungspuffer, PCR-Beschleuniger, Reaktionsschemata, etc. tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 8: **Optimierungspuffer**

•12 verschiedene Puffer (~KCl-Puffer) **•$MgCl_2$-Puffer mit Stammlösungen von Perkin Elmer (PE)**

Puffer-Nummer	Puffer	*Tris*-HCl (mM)	pH	$MgCl_2$ (mM)	KCl (mM)		$MgCl_2$ (µl)	PE-Puffer (µl)
1	10x PCR-Puffer	100	8,3	15	250	1,0x Puffer	0,4	1
2	10x PCR-Puffer	100	8,3	15	750	1,25x Puffer	0,5	1
3	10x PCR-Puffer	100	8,3	35	250	1,5x Puffer	0,6	1
4	10x PCR-Puffer	100	8,3	35	750			
5	10x PCR-Puffer	100	8,8	15	250			
6	10x PCR-Puffer	100	8,8	15	750			
7	10x PCR-Puffer	100	8,8	35	250			
8	10x PCR-Puffer	100	8,8	35	750			
9	10x PCR-Puffer	100	9,2	15	250			
10	10x PCR-Puffer	100	9,2	15	750			
11	10x PCR-Puffer	100	9,2	35	250			
12	10x PCR-Puffer	100	9,2	35	750			

Tabelle 9: **PCR-Reaktionsbeschleuniger**

	Tris-HCl (mM) 1:50	pH	*EDTA* (nM)
-Mastermix	20	8,0	250
-Dimethylsulfoxid (DMSO)			
-$(NH_4)_2 SO_4$ (375 mM)			

DMSO und Formamid konnten die Ausbeute z.T. erhöhen bzw. die Bildung unspezifischer Nebenprodukte unterdrücken.

Tabelle 10: **PCR-Reaktionsschema**

Initialdenaturierung	96°C	10 min
30 bis 35 Zyklen zur exponentiellen Anreicherung		
Denaturierung	96°C	10-20 sec
Hybridisierung der Primer	53-57°C	30 sec
Elongation (Synthese)	70-72°C	3 min
Abschließende Synthese	72°C	30 min

Tabelle 11: **PCR-Profile der verwendeten Mikrosatellitenmarker**

Mikrosatelliten-marker	Puffer	PCR-Profil	Mikrosatelliten-marker	Puffer	PCR-Profil
D11S921	1,5-MgCl-Puffer	96°C-10 min 96°C-20 sec 55°C-30 sec) 30x 72°C-3 min 70°C-30 min	D11S4200	Puffer No. 7	96°C-10 min 96°C-10 sec 55°C-30 sec) 35x 72°C-3 min 72°C-30 min
D11S930	Puffer No. 11	96°C-10 min 96°C-20 sec 55°C-30 sec) 35x 72°C-3 min 72°C-30 min	D11S4148	Puffer No. 11	96°C-10 min 96°C-20 sec 55°C-30 sec) 35x 72°C-3 min 72°C-30 min
D11S1324	1,5-MgCl-Puffer	96°C-10 min 96°C-20 sec 55°C-30 sec) 30x 72°C-3 min 70°C-30 min	D11S554	1,0-MgCl-Puffer	96°C-10 min 96°C-10 sec 55°C-30 sec) 30x 72°C-3 min 70°C-30 min
D11S907	1,5-MgCl-Puffer	96°C-10 min 96°C-20 sec 55°C-30 sec) 35x 72°C-3 min 72°C-30 min	D11S1361	Puffer No. 12	96°C-10 min 96°C-20 sec 55°C-30 sec) 35x 72°C-3 min 72°C-30 min
D11S1392	Puffer No. 12	96°C-10 min 96°C-20 sec 55°C-30 sec) 35x 72°C-3 min 72°C-30 min	D11S1985	Puffer No. 12	96°C-10 min 96°C-20 sec 55°C-30 sec) 35x 72°C-3 min 72°C-30 min
D11S995	Puffer No. 7	96°C-10 min 96°C-20 sec 53°C-30 sec) 35x 72°C-3 min 70°C-30 min	WT1	1,5-MgCl-Puffer	96°C-10 min 96°C-20 sec 55°C-30 sec) 30x 72°C-3 min 70°C-30 min

4.3.4 Optimierung der PCR und Zusammenfassung der PCR-Bedingungen für LOH-Analyse

Um unspezifische Produkte in der PCR zu vermeiden, ist es notwendig, die optimalen Bedingungen für die Hybridisierung der Primer (abhängig vom GC-Gehalt und der Länge der Oligonukleotide) und den optimalen PCR-Puffer zu testen. Bei der Zusammensetzung des Reaktionspuffers ist vor allem die Konzentration an Mg^{2+}-Ionen entscheidend: ist sie zu hoch, entstehen unspezifische Produkte, ist sie zu gering,

verringert sich die Ausbeute (McPherson *et al.*, 1991). Allgemein verbessert die Zugabe von Mg^{2+}-Ionen die Spezifität der PCR-Produkte, die Funktion der Enzyme, sowie die Spezifität der Primeranlagerung (Hildebrandt und Singh-Sawchney, 1999). Die optimale Konzentration hängt spezifisch vom jeweiligen Primer ab.

Es wurden neben dem vom Hersteller empfohlenen PCR-Puffer und der $MgCl_2$-Lösung noch 12 weitere PCR-Puffer unterschiedlicher Zusammensetzung aus einem selbst erstellten PCR-Optimierungskit verwendet. Diese fertigen Puffer variieren in ihren pH-Werten (8,3 bis 9,2) und in ihren $MgCl_2$-(1,5 bis 3,5 mM) und KCl-Konzentrationen (25 bis 75 mM). Dementsprechend wurden durch Optimierung die jeweils optimalen Bedingungen für die unterschiedlichen Primerpaare herausgefunden, die in der Tabelle dargestellt wurden.

4.3.5 Gelelektrophorese

Die Endprodukte einer PCR-Reaktion, die sogenannten Amplikons, stellen DNA-Fragmente dar, deren Basenpaarlänge normalerweise von den eingesetzten Mikrosatellitenmarkern vorgegeben werden. Durch den Einsatz sehr unterschiedlicher Techniken kann das Amplikon sichtbar gemacht werden und dadurch auch Informationen über die Beschaffenheit gewonnen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Polyacrylamidgele zur Darstellung der Amplikons verwendet.

Polyacrylamid (PAA)-Gel (Minigel)

Für die Herstellung von 4 Minigelen wurde ein Gemisch bestehend aus 25,1 ml einer Stammlösung, aus 30% Acrylamid, 10 x TBE-Puffer,Glycerol und H_2O, unter Zugabe von 150 µl APS (25%) und 9 µl TEMED gebildet. Diese Mixtur wurde zwischen die zuvor präparierten Glasplatten, der Gelapperatur von BioRad gegossen. Zur Bildung von Probentaschen wurden Gelkämme zwischen die Gelplatten eingebracht. Innerhalb von 15 min war die Polymerisation des Gels abgeschlossen und es konnten die Gelkämme entfernt werden. Dazu wurde das Gel in ein Bad aus 1 x TBE-Puffer (Apparatur von BioRad) positioniert. Die Proben, die zuvor mit ca. 5 µl Stopplösung versetzt wurden, wurden im folgenden Schritt in die Geltaschen aufgetragen. Dann wurde eine Spannung von 240 V angeschlossen. In dem hergestellten elektrischen Feld fand eine Auftrennung der Amplikons in Abhängigkeit von ihrer Basenpaarlänge statt. Nach ca. 40 min wurde eine ausreichende Fragmentauftrennung erwartet. Das Gel wurde von den Glasplatten abgelöst und zur Einfärbung in 0,5%iger

Ethidiumbromidlösung eingelegt. Der Fluoreszensfarbstoff, der in die DNA interkaliert, stellte nach 10 minütiger Färbung unter dem UV-Transilluminator die aufgetrennten DNA-Fragmente dar. Zur Grössenbestimmung wurden 50 bp-Grössenmarker, sowie Kontroll-PCR-Produkte (hergestellt aus Wildtyp-DNA) in Probentaschen mitgeführt. Zur Dokumentation wurden Fotos dieser PAA-Gele gemacht.

4.3.6 Loss of Heterozygosity (LOH)-Analyse

Die Loss of Heterozygosity (LOH-) Analyse basiert auf der Untersuchung von Polymorphen genetischen Markern des menschlichen Genoms. Es werden sog. Mikrosatelliten-Polymorphismen, bei dem sich die Allele durch die Anzahl kurzer repetiver Seqenzen unterscheiden, verwandt. Hat der Patient verschiedene Allele von seiner Mutter und seinem Vater geerbt, d.h. im Falle der Heterozygotie, kann durch den Vergleich beider Allele in Tumor- und Normal-DNA eines Individuums eine Deletion entsprechend dem sog. Heterozygotie-Verlust (LOH) festgestellt werden.

4.3.7 Mikrosatelliteninstabilität

Im Rahmen der Replikation der DNA einer Zelle kann es zu einem Umschlagen eines DNA-Stranges kommen, sodass zusätzliche Basen die ursprüngliche Mikrosatellitensequenz verlängern. Normalerweise würde dieser „Ablesefehler“ durch DNA Reperaturenzyme korrigiert werden, tritt dies allerdings nicht ein, entsteht ein zusätzliches Allel unterschiedlicher Länge. In einem Gel kann dieses „verlängerte“ Allel z.B. durch unterschiedliche Laufzeit im Polyacrylamidgel als zusätzliche Bande im Vergleich zum Wildtyp entdeckt werden.

4.3.8 Fractional allelic loss (~FAL)

FAL ist definiert als die Anzahl von LOH dividiert durch die Anzahl aller informativer Tumoren.

4.4 Zwei Methoden der LOH-Bestimmung

In der vorliegenden Arbeit wurde die LOH-Analyse grundsätzlich mit der Methode der radioaktiven Markierung von ausgesuchten Mikrosatellitenmarkern angewandt. Im Chromosomenabschnitt um das *WT1*-Gen wurde durch Auswahl von 4 verschiedenen Mikrosatellitenbereichen ein Schwerpunkt des Fine-Deletion Mapping gesetzt. Um möglichst genaue Ergebnisse in diesem Bereich zu erhalten, wurden die Mikrosatelliten D11S1392, D11S995, D11S554 mittels der sensibleren automatischen Sequenzierung analysiert. Die Mikrosatellitenregion D11S1985 wurde bereits von der Arbeitsgruppe um Hessman bei der Analyse von *MEN1*-assoziierten NPTs mit der Methodik der automatischen Sequenzierung untersucht (Hessman *et al.*, 2001). Um die Ergebnisse optimal vergleichen zu können, wurde auch von uns dieser Marker mit der automatischen Sequenzierung untersucht.

4.4.1 LOH über radioaktive Markierung

Die Suche nach Verlust an Heterozygosität (LOH) in einem Mikrosatellitensatellitenabschnitt kann mit Hilfe unterschiedlicher Methoden durchgeführt werden.

4.4.1.1 Radioaktive Markierung des Primers

Eine Primer-Markierung wurde mit Hilfe eines bestimmten PCR-Profils unternommen, wobei radioaktiv markierte Nucleotide, in diesem Fall ATP, in den Primer eingebaut wurden.

Zunächst wurde eine Mischung aus 1 µl *forward*-oder, wie in diesem Fall, *reverse* Primer mit 1 µl Polynukleotidkinase (PNK: 10 U/µl) , 1 µl 10 x PNK-Puffer, 4,5 µl H_2O und 2,5 µl [γ-^{33}P] ATP in einem 10 µl-Ansatz zusammengefügt. Nach einer Vermischung der Komponenten wurden sie für 45 min bei einer Temperatur von 37°C und für 5 min bei 68°C inkubiert.

Der so markierte Primer wurde nun in einen Standard-10 µl-PCR-Ansatz mit aufgenommen. Durch die Anlagerung an die zu vervielfältigenden DNA-Fragmente wurden diese durch Gelelektrophorese in einem denaturierenden Polyakrylamidgel nachweisbar.

4.4.1.2 Polyakrylamidgel für die Mikrosatellitenanalyse

Die Schmelzeigenschaften von doppelsträngiger DNA, deren Einzelstränge nur in einem einzigen Basenpaar differieren, weichen nur leicht voneinander ab. Der Übergang von einer doppel- zur einzelsträngigen DNA ist in einer Polyacrylamidelektrophorese aufgrund der schlechteren elektrophoretischen Laufeigenschaften der einzelsträngigen DNA gut zu verfolgen. Das für diese Arbeit verwendete Gel bewirkte durch den Zusatz von Harnstoff die Denaturierung der DNA-Fragmente in Einzelstränge und damit eine verlangsamte Wanderung durch das Gel. Die erhaltenen DNA-Einzelstränge wurden durch Autoradiographie auf einem Fotofilm sichtbar. Aufgrund verminderter Intensität oder Wegfall der Banden vom Tumormaterial im Vergleich zu den entsprechenden Banden des Patientenblutes konnte LOH nachgewiesen werden, was dann in mindestens einer Wiederholung der Analyse bestätigt wurde.

Zunächst wurden 35 x 50 cm große Glasplatten der Gelapparatur der Firma BioRad gründlich mit Spülmittel gewaschen. Zur Entfettung dienten Ethanol, Isopropanol und 5% DMDCS. Eine der Glasplatten wurde mit 5% DMDCS beschichtet, um später die Ablösbarkeit des Gels zu vereinfachen. Beide Glasplatten wurden mit den so behandelten Seiten zueinander und mit Abstandhaltern von 2 mm Dicke beidseits in die Seitenspanner eingebaut.

Ein Gelgemisch wurde aus 24,3 ml 30% Acrylamidlösung, 45 ml H_2O, 12,0 ml 10 x TBE-Puffer und 50,4 g Harnstoff (UREA) auf einem Heizmagnetrührer leicht erwärmt und gleichzeitig vermischt. Sobald der Harnstoff sich gelöst und die nun klare Flüssigkeit mit Hilfe von Eis auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 160 µl 25% APS und 40 µl TEMED hinzugefügt und zur Vermischung geschwenkt. Diese Mixtur wurde zwischen die präparierten Gelglasplatten in Gießvorrichtung gegossen. Umgehend wurden Haifischzahnkämme (0,2 mm dick) mit der stumpfen Seite ca. 0,5 cm tief zwischen die Glasplatten geschoben, um die späteren Probentaschen freizuhalten.

Die Erstarrung des Gels setzte nach ca. 1 Stunde ein. Nach dem Einspannen des Gels in die BioRad-Gelkammer wurde das Gel in 1 x TBE-Puffer gestellt und die Haifischkämme in ihre richtige Position gebracht. Die Proben einer zuvor durchgeführten PCR-Reaktion unter Einsatz radioaktiv markierter Mikrosatellitenmarker wurden mit je 5 µl Stoplösung versetzt, bei 96°C in einem Heizblock für 5 min denaturiert und sofort auf Eis gekühlt, bevor 4 µl Probe in die vorgeformten Geltaschen eingebracht wurden. An der Gelapparatur wurde ein

Stromfluß von 2000-2500 W angelegt. Nach ca. 2 Stunden, je nach Fragmentlänge, wurde das Gel aus der Apparatur entnommen und auf ein Filterpapier aufgelegt. Bedeckt mit Frischhaltefolie wurde es anschließend durch den Gel Slab Dryer (Farmingdale, USA) innerhalb von 2 Stunden bei einer Temperatur 80°C getrocknet. Daraufhin wurde auf das Gel in einer Fotokassette (Phillips, Agfa) ein entsprechender Film von Kodak für ungefähr 24 Stunden aufgelegt. Der Film wurde entwickelt und zeigte ein spezifisches Bandenmuster, das DNA-Fragmente der PCR-Reaktion widerspiegelt.

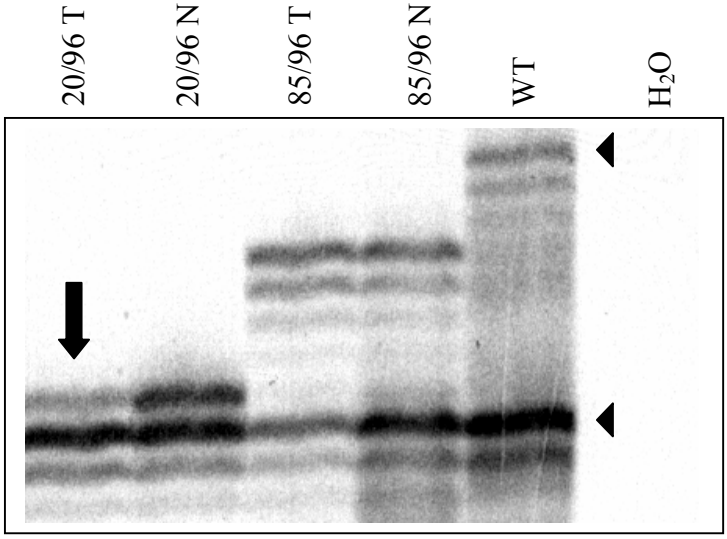


Abbildung 2: Beispiel eines Polyacrylamidgels des Mikrosatellitenmarkers D11S1361
20/96 zeigt LOH (Pfeil) und 85/96 zeigt Retention der Heterozygotie. Die Pfeilspitzen geben das väterliche und mütterliche Allel an.

Die Auswertung der durch Autoradiographie der Polyacrylamidgele erhaltenen Filme erfolgte am entstandenen Bandenmuster der DNA-Fragmente. Das Bandenmuster der Wildtyp-DNA zeigt deutlich 2 intensive Banden wie beispielhaft in Abbildung 2 dargestellt. Je eine Bande (Pfeilspitzen) entsteht durch die spezifische Mikrosatellitensequenz des mütterlichen, bzw. väterlichen Allels. Die umliegenden weniger intensiven Banden stellen sogenannte Konformationsbanden, Nebenbanden dar, die durch alternativ gefaltete Sequenzen eines jeden Allels entstehen können. Bei LOH kommt es zu einem Verlust von Heterozygotie, also Wegfall eines Allels und damit einer Bande des Tumors. Ist eine Bande von Tumor-DNA lediglich reduziert intensiv im Vergleich zur Normal-DNA-Bande, so erklärt sich dies daraus, dass die meisten pathologischen Tumorproben eine Mixtur von Tumor- und Nichttumor- oder Stromagewebe enthalten. Dieses zeigt beispielhaft 20/96 in Abbildung 2 (Pfeil). Ein

LOH liegt dann vor, wenn eine Reduktion der Bandenintensität von mindestens 50% erkennbar ist. Proben, die bereits in ihrer „Normal“-(Blut-)DNA nur eine Bande zeigen, sind von vorne herein homozygot und können für LOH nicht ausgewertet werden. Hier entspricht entweder das mütterliche dem väterlichen Allel oder bereits in der Keimbahn kam es zu einem Allelverlust.

4.4.2 LOH über automatische Sequenzierung

Eine weitere Möglichkeit der Detektion von Polymorphismen in DNA, stellt die automatische Sequenzierung dar. Hierbei wurde ein bereits von der Herstellerfirma markierter Primer verwendet.

4.4.2.1 Markierung des Primers mit einem Fluoreszenz-Amidit

(s. Handbuch: User Bulletin Nummer 78)

Im letzten Schritt der chemischen Primerherstellung werden am 5´-Ende Fluoreszenzamidite, bestehend aus 6-FAM Amidit, HEX Amidit oder TET Amidit, eingebaut. Die unterschiedlichen Amidite zeigen jeweils spezifische Fluoreszenzbereiche an. So wird das Analyseergebnis als Kurvendiagramm dargestellt.

Dieser so modifizierte Primer wurde, wie der radioaktiv markierte Primer zu dem konventionellen 10 µl-PCR-Ansatz hinzugefügt. Um das Ergebnis der PCR-Reaktion zu kontrollieren wurden ca. 5 µl des Eluats mit ca. 4 µl Stopp-Lösung versetzt auf ein Minigel aufgetragen. Nach der Darstellung eines angemessenen Reaktionsproduktes in entsprechender bp-Länge, wurde die Probe, je nach Intensität im Polyakrylamidgel (Minigel) verdünnt und zu 1 µl dieser Verdünnung 12 µl Formamid und als Längenstandard 0,5 µl Genescan 400HD hinzugefügt. Der Sequenzer analysierte anschließend die Reaktionsergebnisse der PCR und stellte sie auf einem Analyseprogramm der Firma Perkin-Elmer dar.

4.4.2.2 Durchführung der fluoreszenzunterstützten Alleltypisierung auf dem ABI 310 Genetic Analyzer

(frei nach Perkin Elmer, Applied Biosystems, USA)

Für die Detektion des „Loss of Heterozygosity“ (LOH) bzw. der Mikrosatelliteninstabilität (MIN) stand ein ABI 310 Genetic Analyzer zur Verfügung, der die automatisierte fluoreszenzunterstützte Alleltypisierung mit hohem Probendurchsatz ermöglicht. Vor Beginn der Mikrosatellitenanalyse wurde

die PCR für jeden ausgesuchten Marker optimiert. Nach Optimierung der PCR wurden die Ansätze einzeln oder in einem Multiplex-Ansatz (Analyse von drei verschiedenen Markern gleichzeitig möglich) im 310 Genetic Analyzer anhand ihrer Laufeigenschaften aufgetrennt. Die Emissionssignale der Fragmente und des Längenstandards wurden mit Hilfe eines Argon-Lasers photometrisch erfasst und über eine mitgelieferte Software-Anwendung (GeneScan Analysis Vers. 2.1.1) ausgewertet (Beispiel siehe Abb. 3). LOH wird definiert als die Intensitätsreduktion eines Tumoralleles um mehr als 50% im Vergleich zur Intensität des korrespondierenden Allels im Normalgewebe. Ein Locus ist nur dann aussagekräftig, wenn er auch in der Normalkontrolle heterozygot ist.
Gemäß den Angaben von Perkin Elmer, Applied Biosystems ist der LOH-Wert in einer fluoreszenzunterstützten Mikrosatellitenanalyse wie folgt definiert:

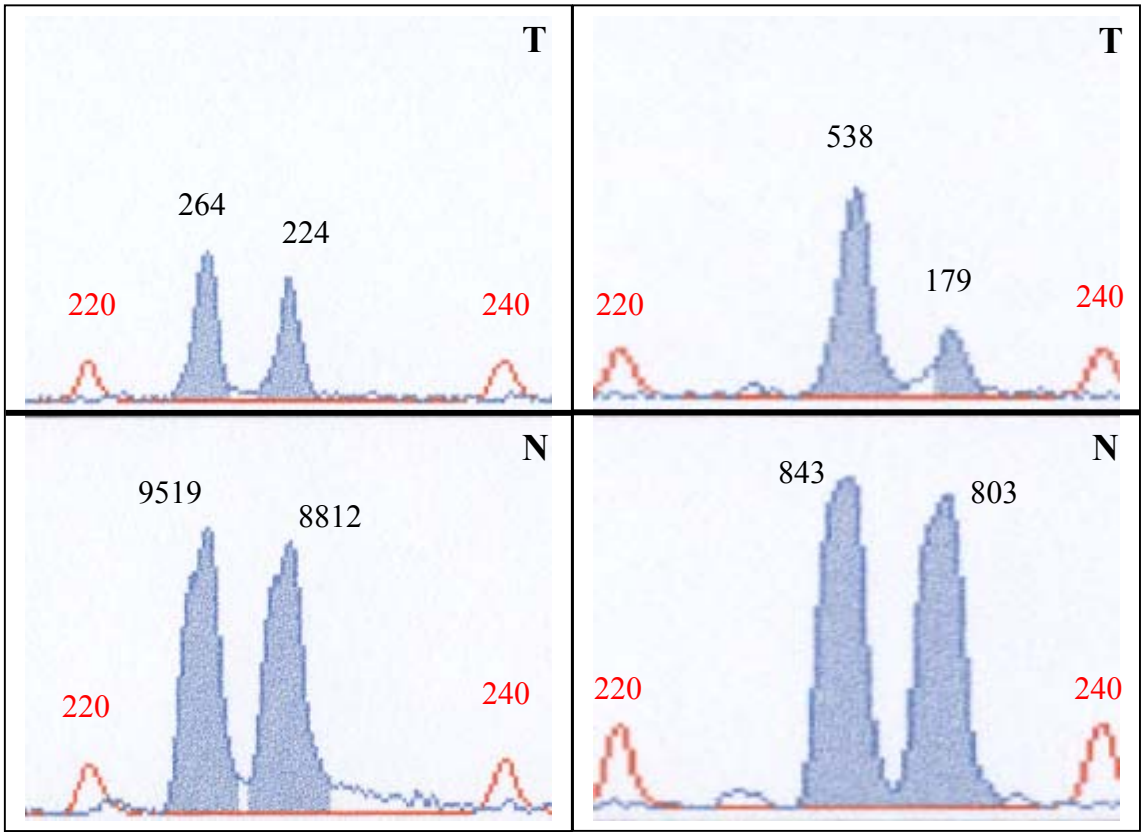
$$\text{LOH} = \frac{\text{(Peak-Höhe von Normal-Allel 2 (N2)) : (Peak-Höhe von Normal-Allel 1 (N1))}}{\text{(Peak-Höhe von Tumor-Allel 2 (T2)) : (Peak-Höhe von Tumor-Allel 1 (T1))}}$$

Ein LOH von ≤0,5 indiziert einen signifikanten Verlust des längeren Allels, während ein LOH von ≥1,5 den signifikanten Verlust des kürzeren Allels in der Tumorprobe anzeigt.

In Abbildung 3 ist als Beispiel eine LOH-Analyse eines NPT-Patienten mit dem Marker D11S554 (Chromosom 11p12-11.2) aufgeführt.

Abbildung 3a: Wildtyp in 11p12-11.2

Abbildung 3b: LOH in 11p12-11.2 (Primer D11S554)



Exemplarisch wurden für die fluoreszenzunterstützte LOH-Analyse auf dem ABI 310 Genetic Analyzer die Auswertungen des Markers D11S554 dargestellt. In (3a) wurde DNA aus Blut bzw. Tumorgewebe (168/98) eines Patienten mit Insulinom amplifiziert. Beide Proben zeigten die normalen Allele und Intensitäten (Fragmentlängen 225 und 229 bp). In (3b) wurde DNA aus Blut (N = Normal) und Tumorgewebe (T) eines Patienten (162/98) mit einem nicht-funktionellen NPT untersucht, wobei ein Identitätsverlust eines Allels, verursacht durch ein LOH-Ereignis in der Tumorprobe, demonstriert wurde (Fragmentlängen 229 und 233 bp). Die auf der Ordinate abgebildeten roten Ziffern bezogen sich auf die Fragmentlängen des internen Längenstandards HD-400 (100, 120 und 150 bp Länge), der zur Längenberechnung der allelischen Fragmente benötigt wurde. Mit Hilfe der im Text angegebenen Formel und den ermittelten Peakhöhen (hier in schwarzen Ziffern) der Allele in Blut und Tumor, errechnete sich ein LOH-Wert von 0,065, was einen signifikanten Verlust des kürzeren Allels in der Tumorprobe 168/98 indizierte.

Alle Experimente wurden mindestens 1 Mal wiederholt, um die Ergebnisse in einer zweiten unabhängigen PCR zu bestätigen. Stellte sich im Laufe einer Alleltypisierung

eine bestimmte chromosomale Region als besonders interessant heraus (Region um das *WT1-Gen* 11p13), d.h. fanden sich dort sehr hohe LOH-Raten, wurde der potentielle Tumorsuppressorlocus über die Auswahl geeigneter weiterer Marker näher eingegrenzt. Im Idealfall sollte sich bei Feststellung hoher LOH-Raten bei einem bestimmten Tumortyp eine definierte, ausreichend kleine Konsensusregion identifizieren lassen, die den Versuch der potentiellen Klonierung eines neuen Tumorsuppressorgens in einem Folgeprojekt rechtfertigt.

4.5 Sequenzierung von WT1

Im Bereich des *WT1-Gen*s wurde eine Mutationsanalyse durchgeführt. Das besondere Augenmerk wurde dabei auf die in den bisherigen Arbeiten am häufigsten von Sequenzveränderungen betroffenen Exone 7, 8 und 9 gelegt (Gerald *et al.*, 1995; Jeanpierre *et al.*, 1998; Patek *et al.*, 1999). Nach Auswahl und Einsatz von geeigneten Primersequenzen wurde zunächst eine SSC-Analyse (Einzelstrang-Konformationsanalyse) angefertigt.

Tabelle 12: **Verwendete Primer für Sequenzierung des *WT1-Gen*s**

	Forward-Sequenz	Reverse-Sequenz	Exongrösse	Sequenzgrösse
Exon 7	CATGTGCTTAAAGCCTCCCTTC	ATGTTTGCCCAAGACTGGAC	150bp	227bp
Exon 8	GCCTTTAATGAGATCCCCTTTT	AGCTGCCAGCAATGAGAAGT	89bp	181bp
Exon 9	CCGAGGCTAGACCTTCTCTGTC	CCTCTCATCACAATTTCATTCC	92bp	195bp

Tabelle 13: **Exonsequenzen**

	Sequenzen
Exon 7	CATGTGCTTAAAGCCTCCCTTCctcttactctctgcctgcagg- atgtgcgacgtgtgcctggagtagccccgactcttgtacggtcggcatctgagaccagtgagaaacgccccttcatgtgtgcttac ccaggctgcaataagagatattttaagctgtcccacttacagatgcacagcaggaagcacactg- gtaagtcgtgccgctGTCCAGTCTTGGGCAAACAT
Exon 8	GCCTTTAATGAGATCCCCTTTTccagtatcattttcaaatagatatgtgtcttccccaag- gtgagaaaccataccagtgtgacttcaaggactgtgaacgaaggttttctcgttcagaccagctcaaaagacaccaaaggagaca taca-ggtttgtaggttcACTTCTCATTGCTGGCAGCT
Exon 9	CCGAGGCTAGACCTTCTCTGTCcatttag- gtgtgaaaccattccagtgtaaaacttgtcagcgaaagttctcccggtccgaccacctgaagacccacaccaggactcatacagg taaaaca- agtgcgtaaacttttcttcacatttatttttcattatttttttaaactattgtGGAATGAAATTGTGATGAGAGG

4.5.1 Single Strand Conformation Analysis (SSCA) des *WT1-Gens*

(nach Newton und Graham, 1994)

Die SSCA (*single strand conformation analysis*) stellt eine Art der Gelelektrophorese dar, mit der sich Mutationen und Polymorphismen nachweisen lassen. Sie basiert auf dem Prinzip, dass die elektrophoretische Beweglichkeit eines Moleküls in der Gelmatrix von seiner Größe, Ladung und Form abhängt. Unter „normalen“, nicht denaturierenden Bedingungen ist ein DNA-Einzelstrang gefaltet, was auf intramolekularen Basenpaarungen, die von der Sequenz vorgegeben wird, beruht. Bei einem SSCA-Gel werden zuvor denaturierte DNA-Kopien auf ein nicht denaturierendes Gel zur Elektrophorese aufgetragen. Im Gel offenbaren sich so bereits geringfügige Veränderungen in der Basensequenz durch unterschiedliche Laufeigenschaften.

Die in unserer Arbeit durchgeführte Amplifikation des genomischen *WT1*-Fragmentes mittels PCR, wurde mit 100 ng genomischer DNA der Patienten und der Kontrollpersonen unternommen. Zunächst wurden durch den Einbau von α-[^{33}P]-dCTP in die DNA-Fragmente diese markiert. Es wurde ein Mastermix (10µl Ansatz), bestehend aus jeweils 0,4 µl Primer (forward und reverse), 0,8 µl NTPs, 1 µl 10 x-PCR-Reaktionspuffer mit 1 µl $MgCl_2$, sowie 4,3, bzw. 4,7 µl H_2O und 0,5, bzw. 0,1 µl Taq-Polymerase mit 0,1 µl α-[^{33}P]-dCTP versetzt und auf die in einem 500 µl Gefäß befindlichen 0,1 µl DNA gegeben. Nach Durchmischen der Reaktionspartner wurde eine PCR-Reaktion auf einem Thermocycler mit

folgendem Reaktionsprofil durchgeführt: Initialdenaturierung bei 96°C für 3 min, gefolgt von 35 Zyklen von 96°C für 30 sec, 60°C für 30 sec, weitere 72°C für 30 sec und abschließend einer Synthesephase bei 72°C für 10 min.

Das gewonnene PCR-Produkt wurde mit 5 µl Stop-Lösung versetzt für 5 min in einem Heizblock denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt, um eine sofortige Renaturierung zu verhindern. 4 µl der Proben wurde auf SSCA-Gele aufgetragen.

Zur Herstellung eines SSCA-Gels wurde zunächst die Apperatur der Firma BioRad, wie in beschrieben, vorbereitet. Nun wurde eine Gelmixtur aus 29 ml 30%-Acrylamidlösung, mit 64 ml H_2O, 6 ml 10 x TBE-Puffer, 160 µl 25%-APS und 40 µl TEMED für das SSCA-Gel ohne Glycerin erstellt. Für den Mix für das SSCA-Gel mit Glycerin wurden 5 ml H_2O weniger eingesetzt und stattdessen diese Menge durch Glycerin ausgeglichen. Glycerin konnte die Empfindlichkeit der Methode noch verstärken, wodurch die allgemeine Nachweisbarkeit von Polymorphismen bei Amplikons mit bis zu 450 bp nahezu 90% und in Amplikons mit max. 300 bp beinahe 99% betrug. Die jeweils angefertigte Mischung wurde zwischen die Glasplatten in die Gießvorrichtung gegossen. Daraufhin wurden Haifischkämme (von 2 mm Stärke) ca. 0,5 cm in das Gel zur Freihaltung von Probentaschen und zur Erstellung einer exakten Lauffront eingebracht. Innerhalb einer Stunde war die Erstarrung des Gels abgeschlossen und das Gel konnte, eingespannt in der Apparatur (BioRad), in 0,6 x TBE-Puffer gestellt werden. Die zuvor denaturierten Proben wurden nun in die von Haifischkämmen geformten Taschen aufgetragen und bei 3-6 Watt für ca. 20 Stunden (abhängig von der Fragmentlänge) aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel auf Filterpapier, bedeckt mit Frischhaltefolie auf dem Geltrockner (Gel Slab Dryer) bei 80°C für 2 Stunden getrocknet. Die bei der PCR-Reaktion in die DNA-Fragmente eingebauten radioaktiven Oligonukleotide machten eine Darstellung der Fragmente auf einen Fotofilm möglich.

Alle SSCA wurden mindestens einmal durch Wiederholung bestätigt. Um Mutationen und Polymorphismen anschließend zu charakterisieren, wurden aufgetretene variante Banden aus dem Gel ausgeschnitten und aus selbigem in 1,5 ml Gefäße in 100 µl sterilem H_2O über Nacht im Heizblock bei 55°C eluiert. 10 µl des gewonnenen Eluats wurden mit jeweils 15 µl der folgenden Mixtur versetzen.

Tabelle 14: **Beispiel eines PCR-Ansatzes für Sequenzierungen**

Chemikalien	25µl-Ansatz (µl)
$Primer_{forward}$	1,0
$Primer_{reverse}$	1,0
NTP	2,0
10x-Puffer	2,5
$MgCl_2$	2,5
H_2O	4,5/ 3,25
Taq	0,25/ 1,5
DMSO	1,25

Es folgte eine Reamplifikation unter optimiertem PCR-Profil in der MWG-Biotech Primus PCR-Maschine. Das erhaltene Reaktionsprodukt wurde mit Zusatz von 7 µl Stopp-Lösung auf ein vorbereitetes Agarosegel aufgetragen.

4.5.1.1 Agarosegelelektrophorese

(nach Sambrook *et al.*, 1989)

Bei dieser Methode der Identifikation von Amplikons wurden Horizontalgelapperaturen mit der Abmessung von 8 x 10 cm für Gele mit 15, bzw. 10 Probentaschen verwendet.

Mit Hilfe einer Microwelle wurde zunächst 3,4 g (entspricht 2%) Agarose in 170 ml 0,5 x TBE-Puffer (0,1 x TE-Puffer) durch Erhitzen aufgelöst. Zur Anfärbung des Gels wurden anschließend 8,4 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Die erhaltene Masse wurde langsam und blasenfrei in die Gelapperatur eingegossen. Die vollständige Erstarrung des Gels setzte nach Einfügen von 10er oder 15er Plastikgelkämmen als Probentaschenbildner nach ca. 30 min ein.

30 µl der Proben wurden zusammen mit 7 µl des Farbmarkers Stopp-Lsg. in die vorgeformten Geltaschen aufgetragen. Zur Grössenbestimmung wurde ein 50 bp-Grössenmarker, sowie Kontroll-PCR-Produkte in zusätzlichen Probentaschen mitgeführt. Nach Auffüllen der Gelkammer mit 0,5x TBE-Puffer (0,1x TE-Puffer) als Laufpuffer wurde eine Spannung von 120 V angelegt und die DNA-Fragment-Auftrennung innerhalb von einer Stunde ermöglicht. Das Gel wurde aus der Apparatur entnommen und unter einem UV-Transilluminator (San Gabriel, USA) analysiert. Die Ergebnissdokumentation erfolgte mit Hilfe eines Fotos.

Zur detaillierteren Betrachtung der Eigenschaften der erhaltenen DNA-Fragmente wurden die Banden unter dem UV-Transilluminator aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und in einem folgenden Schritt aus dem Gel aufgereinigt.

4.5.1.2 Gelextraktion mit QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen (Cat. No. 28706)

Die Extraktion aus einem Agarosegel erfolgte nach der Versuchsvorschrift des verwendeten Kits der Firma Qiagen. Dabei wurde zunächst die ausgeschnittene Gelprobe in einem Gefäß gewogen und das erhaltene Volumen mit 3 multipliziert als QG-Puffer-Volumen (mg ~ µl) hinzugefügt. Über einen Zeitraum von 10 Minuten wurde die Agarose bei 50°C in einem Heizblock gelöst. Danach wurde Isopropanol im gleichen Volumen wie QG-Puffer hinzugegeben und das erhaltene Gemisch auf eine vorgefertigte Säule aus dem Qiagen-Kit gebracht. Nach 1 minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde erneut unter Zugabe von 500 µl QG-Puffer gewaschen. Dieses Procedere wiederholte sich mit 750 µl PE-Puffer. Nach 1-2 Minuten Inkubationszeit wurde ein weiteres Mal zentrifugiert und die Säule auf ein neues Gefäß gegeben. Für weitere 3 Minuten wurde bei 13.000 rpm zentrifugiert und auf die Säule 30 µl HPLC-H_2O oder EB-Puffer pipetiert. Ein letztes Mal wurde für eine Minute zentrifugiert und das erhaltene Eluat konnte mit Hilfe einer Agaroseplatte (Tüpfelplatte) auf seine DNA-Konzentration untersucht werden.

4.5.1.3 Konzentrationsbestimmung der DNA mittels „Tüpfelplatte“

Die Agarose enthaltende Petrischale dient zur Einschätzung der DNA-Konzentration eines Eluats im Rahmen einer Sequenzierung. Das Eluat wurde dabei im Vergleich zu Standardlösungen auf das Gel aufgetragen und unter einem UV-Transilluminator wurde daraufhin die Konzentration durch die Intensität der auftretenden Fluoreszenz sichtbar gemacht. Zur Herstellung einer solchen Agaroseplatte wurden zunächst 3,4 g Agarose in 170 ml 0,5 x TBE-Puffer (0,1 x TAE-Puffer) durch Erhitzen in einer Microwelle aufgelöst. Zur Anfärbung des Gels wurden anschließend 8,4 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Die erhaltene Masse wurde langsam und blasenfrei in die Petrischale gegossen (pro Petrischale ca. 30-40 ml). Nach Erkalten des Gels konnte es für einen begrenzten Zeitraum bis zur Nutzung bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden.
Entsprechend ihrer Verdünnung wurde die DNA mit einem speziellem Premix (Sequenzing Kit) und *Forward*-oder *Reverse*-Primer zur Durchführung einer Sequenzreaktion versetzt.

Tabelle 15: **Beispiel für einen Ansatz**

8 µl Eluat
8 µl Premix (Sequenzing Kit)
1 µl Primer (*Forward* oder *Reverse* in ca. 10 µl Konzentration)
1 µl DMSO
2 µl H_2O

Tabelle 16: **Sequenzreaktion**

96°C	30 sec	
60°C	30 sec	} 30x
60°C	4 min	

4.5.1.4 „Fällung“

Bevor das Reaktionsprodukt zur Sequenzanalyse verwendet werden konnte, wurde eine Fällung mit Ethanol durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 80 µl HPLC-H_2O verdünnt und auf in einem 500 µl Gefäß vorgelegte 10 µl 3M NaAc gegeben. Anschließend wurde nach Zugabe von 250 µl 100% EtOH eine 25 minütige Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm durchgeführt. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt, woraufhin die DNA erneut in 70% EtOH bei 10 minütiger Zentrifugation gewaschen wurde. Im Anschluss daran wurde die Probe nach Entfernung des Überstandes in der SpeedVac für 5-10 Minuten unter Vakuum und Rotation getrocknet.

Die getrocknete DNA wurde mit 25 µl TSR-Puffer der Firma Applied Biosystems für 3 Minuten bei 96°C im Heizblock denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt.

Die abschließende Sequenzanalyse der DNA in den vorbereiteten Proben wurde im automatischen Sequenzierer (ABIPRISM 310 Genetic Analyzer) durchgeführt und mit Hilfe der entsprechenden Software (Sequencing Analysis 3.0 und Sequence Navigator 3.01 Software) ausgewertet (ABI Applied Biosystems, Foster City CA, USA).

4.6 Statistik

Der Fisher´s Exact Test wurde eingesetzt zur Analyse nominaler Daten. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

4.7 Sicherheitsmassnahmen und Datenschutz

Bei allen gentechnologischen Arbeiten wurden die gültigen Vorschriften des Gentechnikrechts eingehalten.

Die Materialverarbeitung und die Auswertung von personengebundenen Daten wurde durch zufallsbedingte Identifikationsnummern verschlüsselt und gemäß dem gültigen Datenschutzgesetz gehandhabt. Die Studie wurde von der Ethikkomission der Philipps-Universität Marburg begutachtet und genehmigt. Jeder Patient wurde über die Studie aufgeklärt und erst nach Unterzeichnung der Einverständniserklärung in die Studie aufgenommen.

5. ERGEBNISSE

5.1 Loss Of Heterozygosity (LOH) - Analysen

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 29 neuroendokrine Pankreastumoren (NPTs) auf Verlust von Heterozygotie (LOH) auf Chromosom 11p untersucht. Unter besonderer Berücksichtigung bekannter „Hot Spots“, die sich im Rahmen von Alleltypisierungen anderer Tumoren herausgestellt haben, wurden 12 Mikrosatellitenmarker ausgewählt (siehe Material und Methoden), deren Positionen über Chromosom 11p verteilt sind. Die einzelnen Marker sind in Abständen von 15.540 bis 9.010.962 bp, bzw. 13.361.841 bp voneinander entfernt (die Position von D11S995 zu den übrigen Markern war nicht zu eruieren) (Tab. 6).

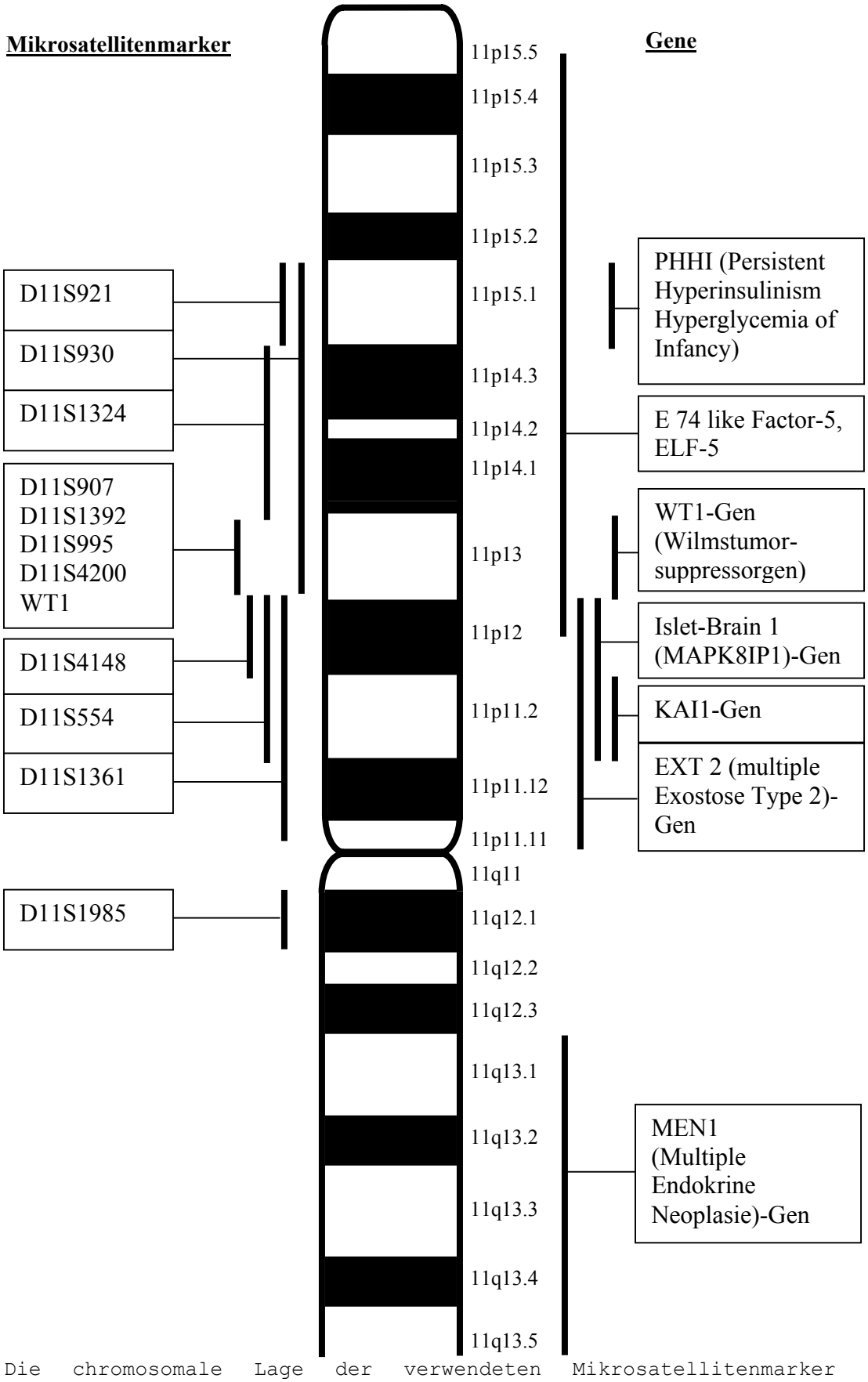
Alle untersuchten Patienten waren für mindestens zwei der zur Analyse eingesetzten Mikrosatellitenmarker informativ. Innerhalb der verwendeten Marker lag die Anzahl der informativen Patientenproben zwischen 33% (9/27) für den Marker D11S1361 und 100% für die Mikrosatellitenmarker D11S955 und D11S554. Der Mikrosatellitenmarker WT1 war für alle Tumorproben nicht informativ, so dass er nicht ausgewertet werden konnte.

Unsere LOH-Analyse konnte bei 20 der 29 Tumoren (69%) mindestens ein LOH auf Chromosom 11p nachweisen. Pro Mikrosatellitenmarker wurden mindestens 2 und höchstens 12 Tumoren mit LOH gefunden.

Die niedrigste LOH-Rate mit 16% zeigte der Marker D11S1324, der sich in der Region 11p14 befindet. Die höchste LOH-Rate mit 43% wurde in der Region 11p11 mit dem Marker D11S1985 festgestellt.

Im Folgenden werden die LOH-Ergebnisse der einzelnen Marker von telomer nach zentromer dargestellt.

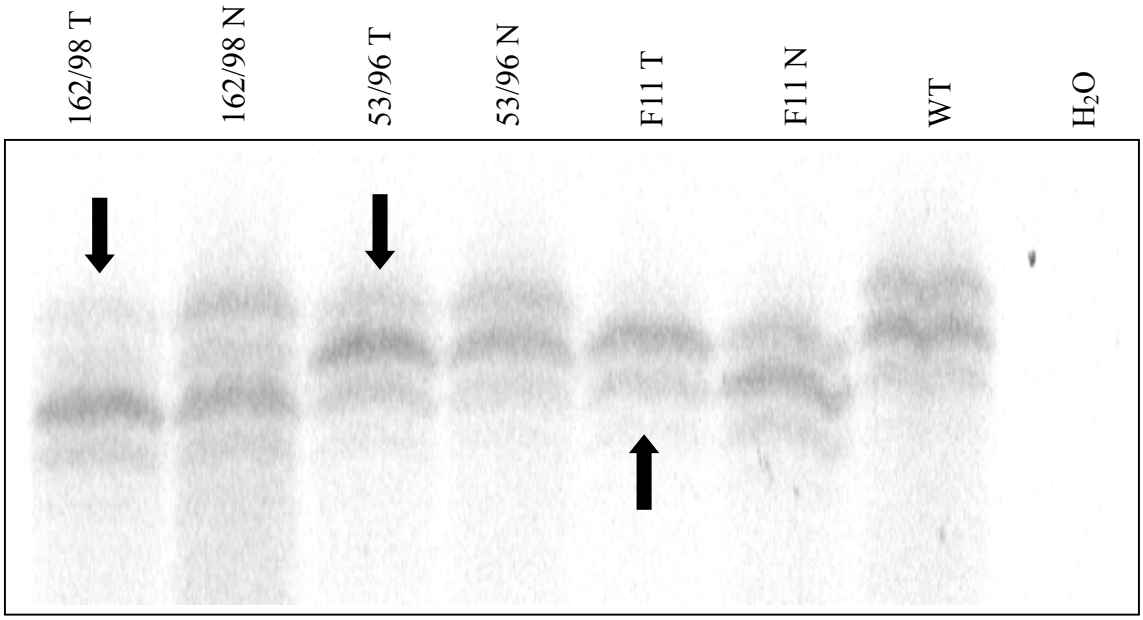
Abbildung 4: **Verwendete Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 11p**



Die chromosomale Lage der verwendeten Mikrosatellitenmarker im Vergleich zur chromosomalen Lage der diskutierten Gene KAI1, WT1, PHHI, EXT2, Islet-Brain1 und MEN1 (nach Genemap und OMIM)

Der Marker D11S921 zeigte bei 6 von 16 informativen Tumoren (37%) einen Verlust von Heterozygotie, darunter 3 von 7 informativen Insulinomen und 3 von 4 informativen nicht-funktionellen NPTs. Die 6 Gastrinome und 2 Vipome zeigten kein LOH. Ein Beispiel für ein LOH des Markers D11S921 zeigt Abbildung 5 dar.

Abbildung 5: Harnstoffgel der LOH-Analyse mit dem Mikrosatellitenmarker D11S921

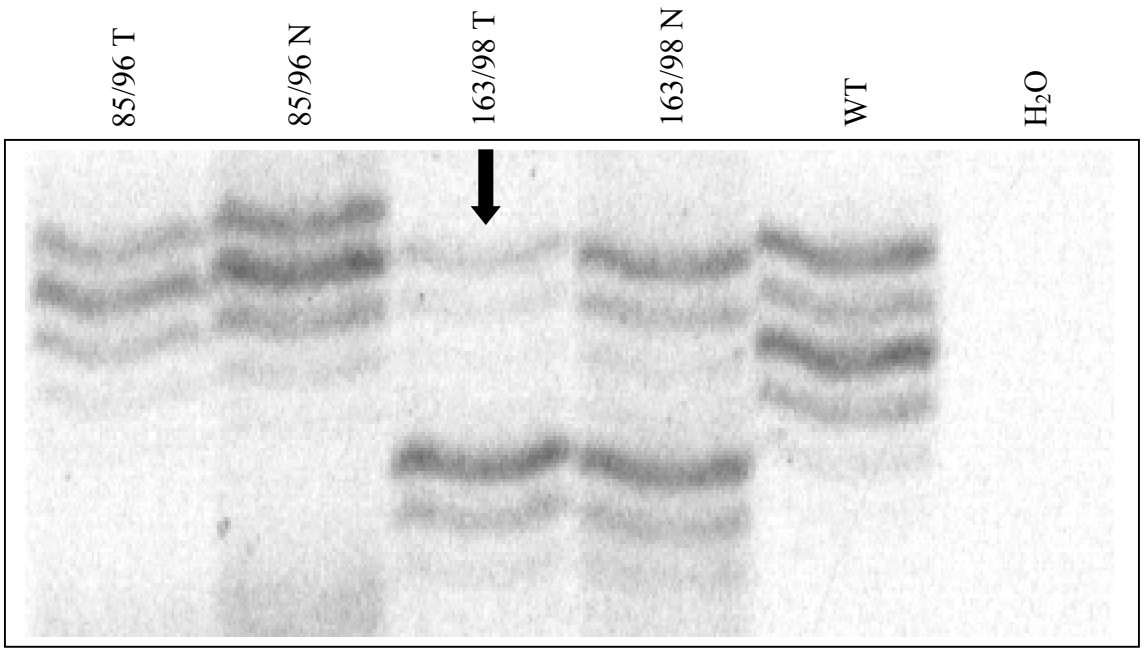


Die Ergebnisse der LOH-Analyse mit dem 243bp bis 255bp langen Mikrosatellitenmarker D11S921 werden auf diesem Harnstoffgel dargestellt. Beispielhaft wurden die Proben der Patienten 162/98, 53/96 und F11 in bezug zu einer Normalprobe (Wildtyp) ausgewählt. LOH ist im Tumormaterial von 162/98, 53/96 und F11 zu erkennen (LOH durch Pfeile markiert). Es wurde eine H_2O negativ-Kontrolle mitgeführt.

Der Marker D11S930 wies bei 20 informativen Tumoren 6 mal einen Verlust von Heterozygotie auf (30%). Die Verteilung auf die unterschiedlichen Tumorarten verhält sich wie folgt: Von 9 informativen Insulinompatienten wiesen 3 einen Verlust eines Allels auf und von 6 nicht-funktionellen NPTs waren 3 durch einen Allelverlust gekennzeichnet.

Die vorliegende Abbildung (6) stellt beispielhaft ein LOH des Tumors 163/98 dar.

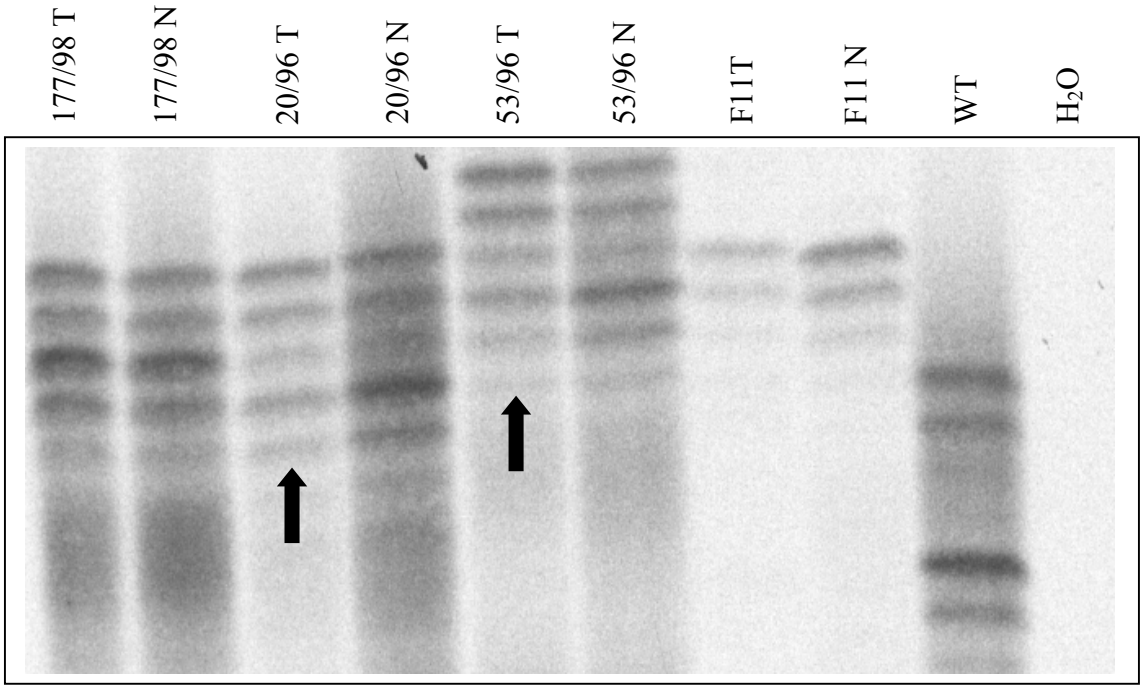
Abbildung 6: Harnstoffgel der LOH-Analyse mit dem Mikrosatellitenmarker D11S930



Harnstoffgel der LOH-Analyse mit dem Mikrosatellitenmarker D11S930
Das Harnstoffgel zeigt die Ergebnisse der LOH-Analyse der Patienten 85/96 und 163/98 im Vergleich zu einer Normalprobe(WT~Wildtyp) und unter Mitführung einer H_2O negativ-Kontrolle. Zur Analyse wurde der bis 237 bp lange Mikrosatellitenmarker D11S930 aufgetrennt. LOH wurde für 163/98 sichtbar (siehe Pfeilmarkierung).

In einem genarmen Abschnitt ist der Mikrosatellitenmarker D11S1324 (11p14) gelegen. Er zeigte bei einer LOH-Rate von 16% in 4 von 25 informativen NPTs. Von 9 informativen Insulinomen zeigte eins LOH, während 2 von 7 nicht-funktionellen NPTs einen LOH aufwiesen und außerdem 1 von 2 informativen Vipomen betroffen war (Abbildung 7).

Abbildung 7: Harnstoffgel einer LOH-Analyse mit dem Mikrosatellitenmarker D11S1324

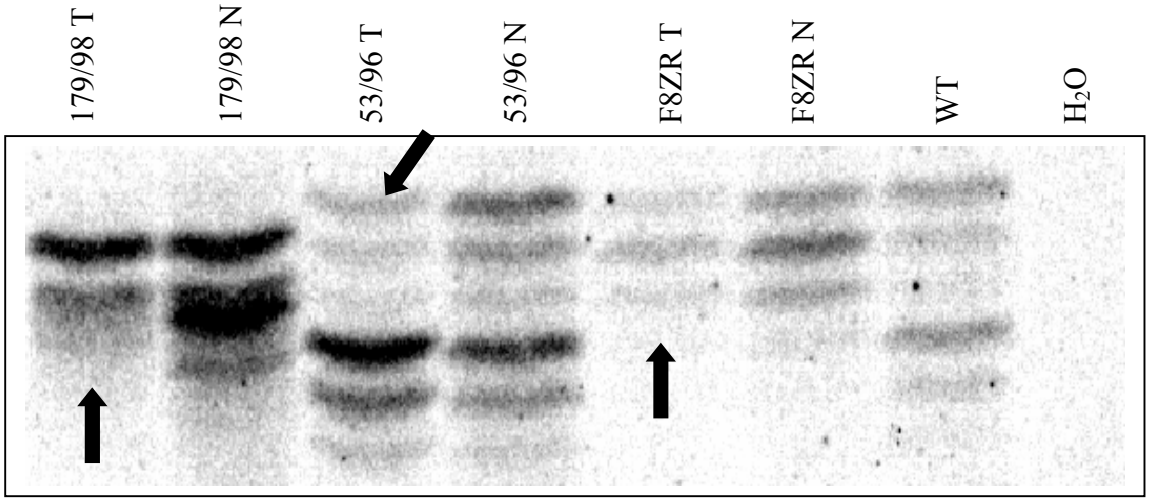


Das Harnstoffgel des Mikrosatellitenmarkers D11S1324 zeigt die Proben 177/98, 20/96, 53/96 und F11 im Vergleich mit einem Wildtyp. Die DNA-Fragmente sind 119bp lang. Bei 20/96 und 53/96 erkennt man eine Retention von Heterozygotie (markiert durch Pfeile). Das Ergebnis für F11 ist nicht-informativ. Eine H_2O negativ-Kontrolle wurde mitgeführt.

Insgesamt 3 Mikrosatellitenmarker befinden sich in der Region um 11p13. Für die drei Marker wurden 6 LOH von 20 informativen Tumoren (30%) bei D11S907, 5 von 20 (25%) bei D11S1392 und 7 LOH von 29 (24%) informativen Tumoren bei D11S955 nachgewiesen.

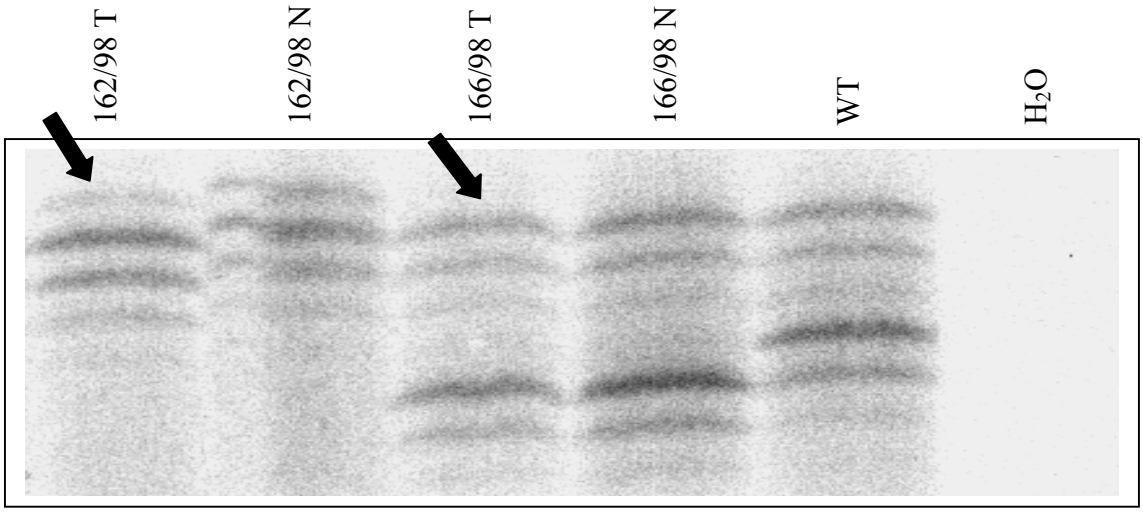
Bei dem Mikrosatellitenmarker D11S907 fand sich LOH in 2 von 8 informativen Insulinomen, bei 1 von 5 Gastrinomen und bei 3 von 7 nicht-funktionellen NPTs Abbildung 8 und 9 zeigen LOH Beispiele für den Mikrosatellitenmarker D11S907.

Abbildung 8: **Harnstoffgel der LOH-Analyse mit dem Mikrosatellitenmarker D11S907**



Die Patientenproben 179/98, 53/96 und F8ZR wurden durch Vergleich mit einem Wildtyp auf LOH hin untersucht. Es zeigte sich in allen Tumoren LOH. Eine negative H_2O- Kontrolle belegt einen sauberen Versuchsansatz.

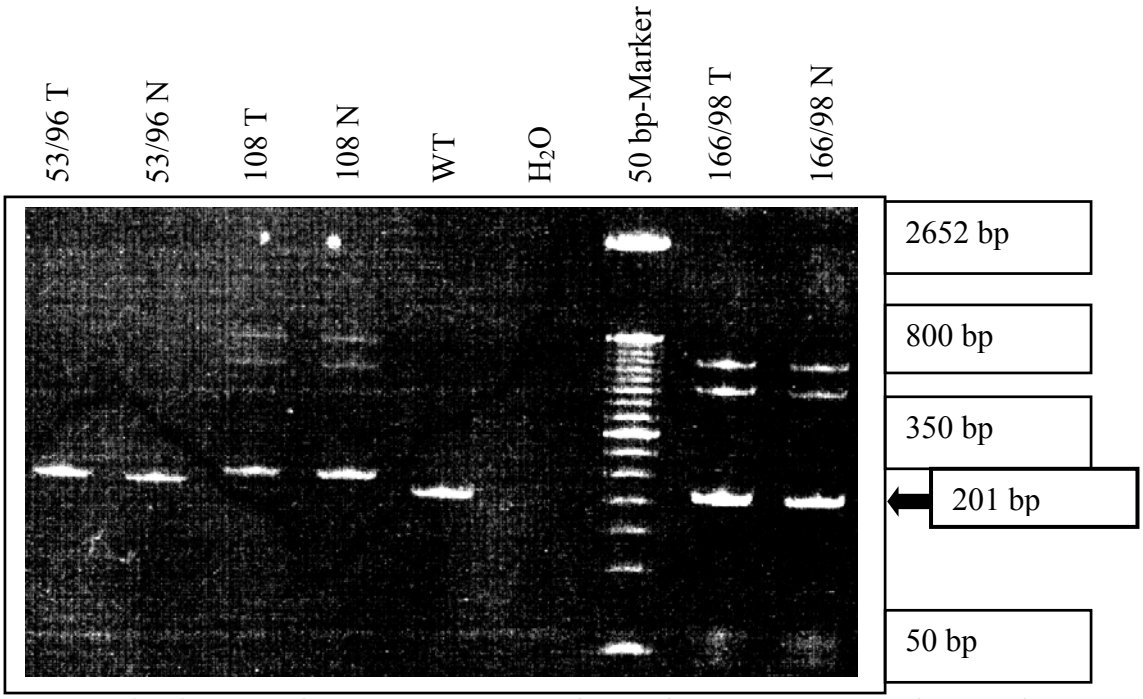
Abbildung 9: **Harnstoffgel der LOH-Analyse von D11S907**



In der Abbildung werden die Proben 162/98 und 166/98 zu einem Wildtyp dargestellt. Im Tumor 162/98 liegt ein LOH vor, der durch eine leicht schwächere Bande im Tumor auffällt (Pfeil). 166/98 zeigt scheinbar eine Retention von Heterozygotie (Pfeilmarkierung), die allerdings in der Wiederholung des Versuches nicht bestätigt werden konnte. Eine H_2O negativ-Kontrolle wurde mitgeführt.

Die Abbildung 10 verdeutlicht die Fragmentauftrennung von D11S1392 bei einer Länge von 201 bp in Form eines sogenannten Minigels. Es diente durch Darstellung der amplifizierten Fragmente im Versuchsansatz als Nachweis einer erfolgreichen PCR-Reaktion.

Abbildung 10: Darstellung eines Minigels zur Analyse der Konzentration der PCR-Produkte vor Einsatz des 310 Genetic Analyzers

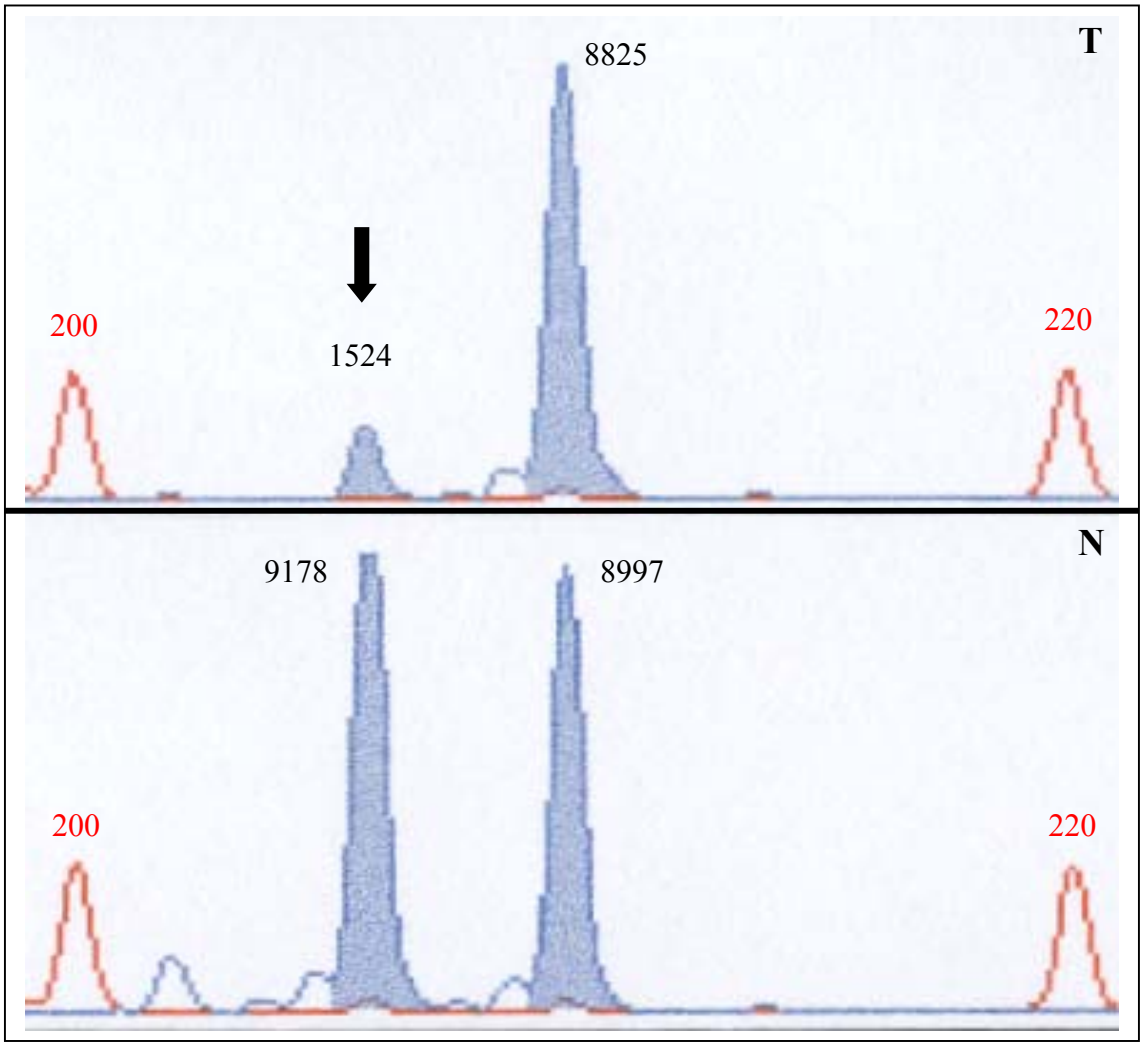


Das Beispiel zeigt den Nachweis einer PCR-Reaktion mit dem Mikrosatellitenmarker D11S1392 durch das Foto eines Minigels auf dem die entstandenen 201 bp langen DNA-Fragmente in Form von Banden dargestellt sind.

Anschließend konnte nach entsprechender Verdünnung der Probe eine Analyse derselben im Analyzer durchgeführt werden. 5 von 20 informativen NPTs zeigten LOH, darunter 2/7 Insulinomen, 0/5 Gastrinomen, 2/7 nicht-funktionellen NPTs und 1/1 Reninom.

Abbildung 11 zeigt den Allelverlust bei F11, der durch die Analyse des 310 Genetic Analyzers ermittelt wurde. Unter Anwendung der in Kap. 5.3.2 beschriebenen Methodik, läßt sich LOH errechnen.

Abbildung 11: Kurvendiagramm des Mikrosatellitenmarkers D11S1392



Die Abbildung stellt ein Beispiel für ein Kurvendiagramm vor, was ein LOH bei dem Patienten F11 im Bereich des Mikrosatellitenmarkers D11S1392 darstellt. Durch die im Tumor stark verminderte Peakhöhe ist der Identitätsverlust eines Allels gut zu erkennen.
T = Tumor DNA, N = Normal DNA, rote Ziffern = Längenstandard, schwarze Ziffern = Peakhöhe, Pfeil = LOH

Bei dem Mikrosatellitenmarker D11S995 wurde eine LOH-Analyse mit Hilfe des 310 Genetic Analyzer von ABI durchgeführt, welche Hinweise auf 1 LOH-Vorkommen bei 11 informativen Insulinomen, entsprechend 1 LOH in 6 Gastrinomen, 3 in 9 nicht-funktionellen NPTs, 1 LOH in 2 Vipomen und LOH im Reninom gab.
Die zu Marker D11S995 vorliegende Abbildung (12) demonstriert ein LOH Beispiel der Analyse durch den Analyzer mit mitlaufendem Längenstandard.

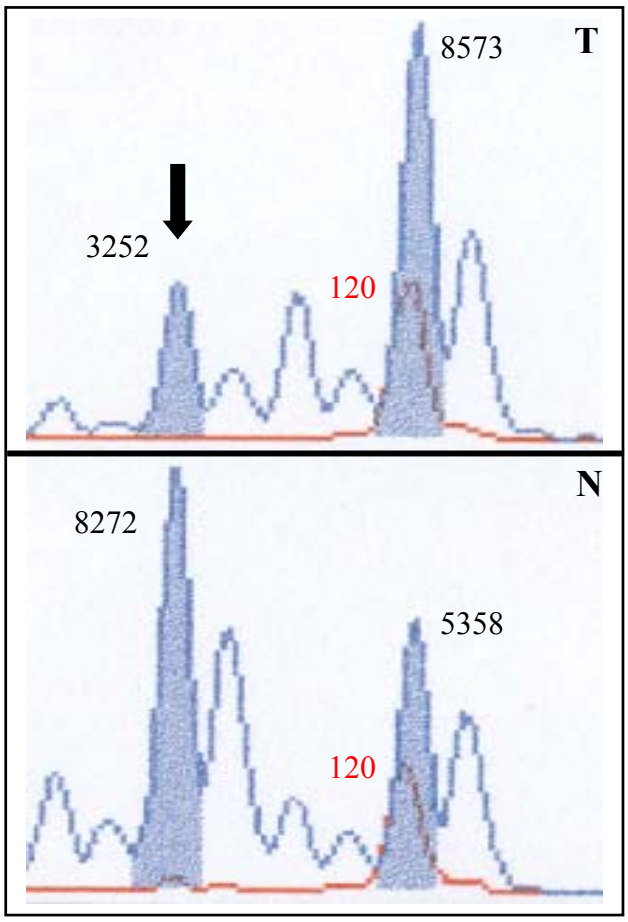
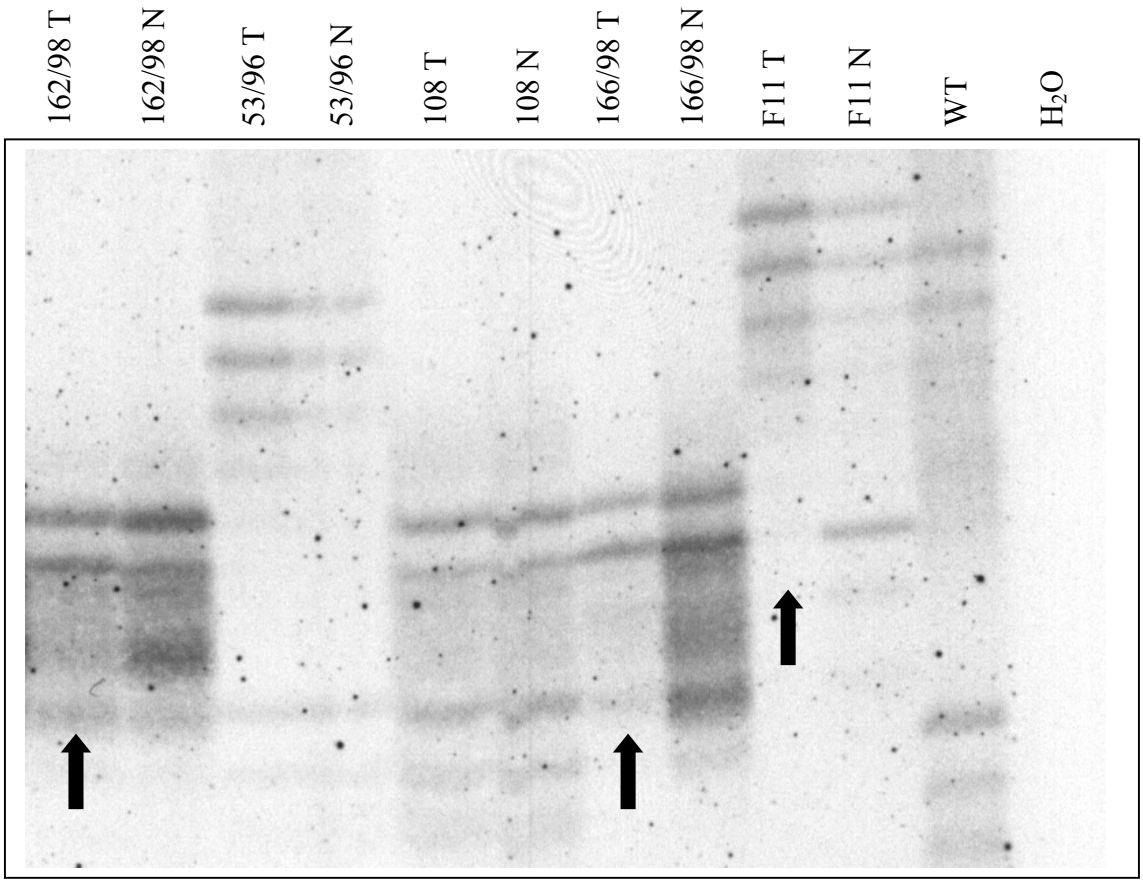


Abbildung 12: Kurvendiagramm von D11S995
Beispiel eines Kurven-diagramms einer LOH-Analyse, nach der Auswertung durch den 310 Genetic Analyzers. Der Verlust von Heterozygotie wird durch den Verlust der Peakhöhe in der Kurve der Tumor DNA-Probe im Vergleich zur Normal DNA des Patienten 179/98 deutlich. Unter Anwendung der im Abschnitt 5.3.2 beschriebenen Methode, lässt sich der LOH eindeutig errechnen:
N2 : N1 / T2 : T1, wobei ein Ergebnis ≥1 oder ≤0,5 einem LOH entspricht. Das heißt in diesem Fall: 5358 : 8272 / 8573 : 3252 = 0,25. N1, N2 und T1, T2 stellen jeweils 2 Allele unterschiedlicher Sequenzlänge dar. Eins stammt vom Vater und eins von der Mutter.
T, entspricht der Tumor DNA
N, entspricht der Normal DNA
rote Ziffern = Längenstandard
schwarze Ziffern = Peakhöhe

Es wurden zwei Mikrosatellitenmarker eingesetzt deren Lokalisationen auf dem Chromosom laut Genome DataBase in der Region um 11p13 (D11S4200) und telomer von 11p12 (D11S4148) gelegen sind (11pter-11qter) (genomic data base).

Bei der Analyse des Mikrosatellitenmarkers D11S4200 zeigten 5 von 21 (24%) der informativen Tumoren LOH. LOH lag bei 3 von 6 informativen Insulinomen und 2 von 9 nicht-funktionellen NPTs vor. Die Abbildung 13 zeigt LOH im Patientenmaterial 162/98, 166/98 und F11.

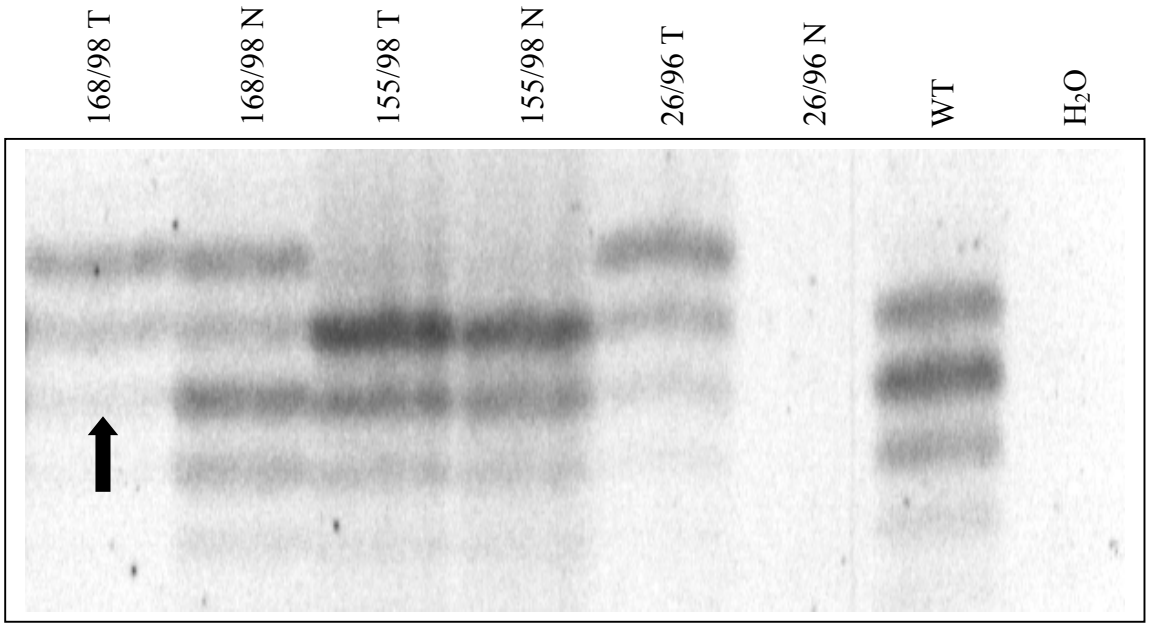
Abbildung 13: Harnstoffgel der LOH-Analyse mit dem Mikrosatellitenmarker D11S4200



Die Ergebnisse der LOH-Analyse mit dem 109 bp langen Mikrosatellitenmarker D11S4200 wurden anhand dieses Harnstoffgels dargestellt. Beispielhaft wurden die Proben der Patienten 162/98, 53/96, 108, 166/98 und F11 in Bezug zu einer Normalprobe (Wildtyp) und einer H_2O negativ-Kontrolle ausgewählt. 162/98, F11 und 166/98 zeigen deutlich LOH (Markierung durch Pfeile).

Die Analyse von D11S4148 ergab eine LOH-Rate von 31%: 6 LOH von 19 informativen NPTs. Bei Fragmentauftrennung der 170 bp langen Fragmente von D11S4148 durch ein Polyacrylamidgel fiel bei der Hälfte von 8 Insulinomen LOH auf. Weitere 2 Patienten der 7 informativen Patienten mit nicht-funktionellen NPTs zeigten LOH. Abbildung 14 zeigt exemplarisch eindeutig LOH in NPT 168/98.

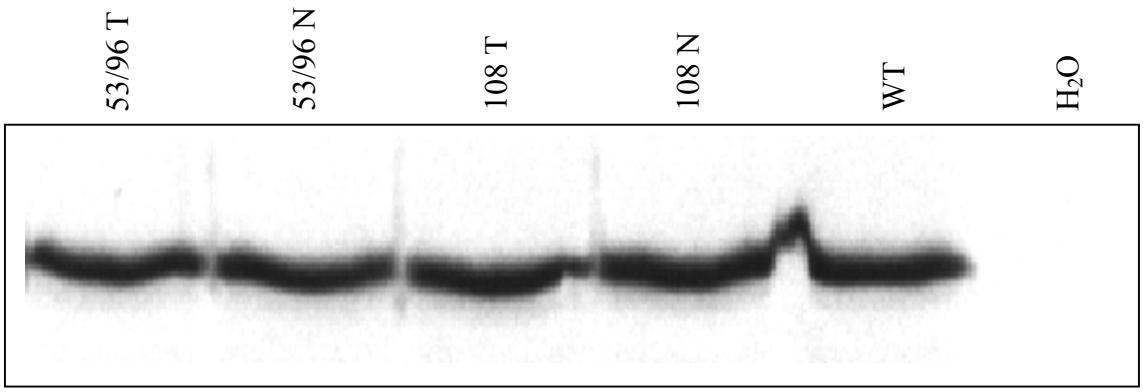
Abbildung 14: Harnstoffgel der LOH-Analyse mit dem Mikrosatellitenmarker D11S4148



Nach der PCR-Reaktion des Markers D11S4148 zeigte er eine Auftrennung von 170 bp- langen Fragmenten, wie in diesem Beispiel-Harnstoffgel. LOH bietet der Tumor 168/98 (markiert durch einen Pfeil), während bei Tumor 155/98 die Heterozygotie erhalten ist. Die Probe der Normal DNA von 26/96 zeigt kein Reaktionsergebnis, was z.B. auf eine zu geringe DNA-Konzentration in der Patientenprobe oder auch auf eine fehlerhafte Funktion der TaqDNA-Polymerase hinweisen kann. Ausserdem wurde eine H_2O negativ-Kontrolle mitgeführt.

Der Mikrosatellitenmarker WT1 (11p11-p13) wurde zur genaueren Analyse der Region um das *WT1-Gen* gewählt. Leider waren die erhaltenen Ergebnisse in Form von Banden auf Harnstoffgelen nicht zufriedenstellend auswertbar, da ausnahmslos alle Patienten für diesen Mikrosatellitenmarker nicht-informativ waren. Dies ist beispielhaft in Abbildung 15 dargestellt.

Abbildung 15: Harnstoffgel der LOH-Analyse mit dem Mikrosatellitenmarker WT1



Sämtliche dargestellten Tumorproben waren nach Auftrag ihres PCR-Produktes von 498 bp Länge auf Harnstoffgele nicht informativ.

D11S554 liegt in einen DNA-Abschnitt zwischen 11p12 und 11p11.2. Hier war eine relativ zu den anderen Regionen hohe LOH-Rate von 12 von 28 informativen Tumoren (43%) zu erkennen. Von 10 Insulinomen zeigten 3, von 6 Gastrinomen 2, von 9 nicht-funktionellen NPTs 6 und von 2 Vipomen eines LOH. Die LOH-Analyse innerhalb dieses Markers wurde anstatt per Polyacrylamidgel mit dem 310 Genetic Analyzer (ABI) vorgenommen.

Die Abbildung 16 mit Längenstandard (hier in rot) spiegelt das Ergebnis für den Patienten 162/98 wieder. Eindeutig berechnen läßt sich der LOH durch die in Kap. 5.3.2 beschriebene Methodik.

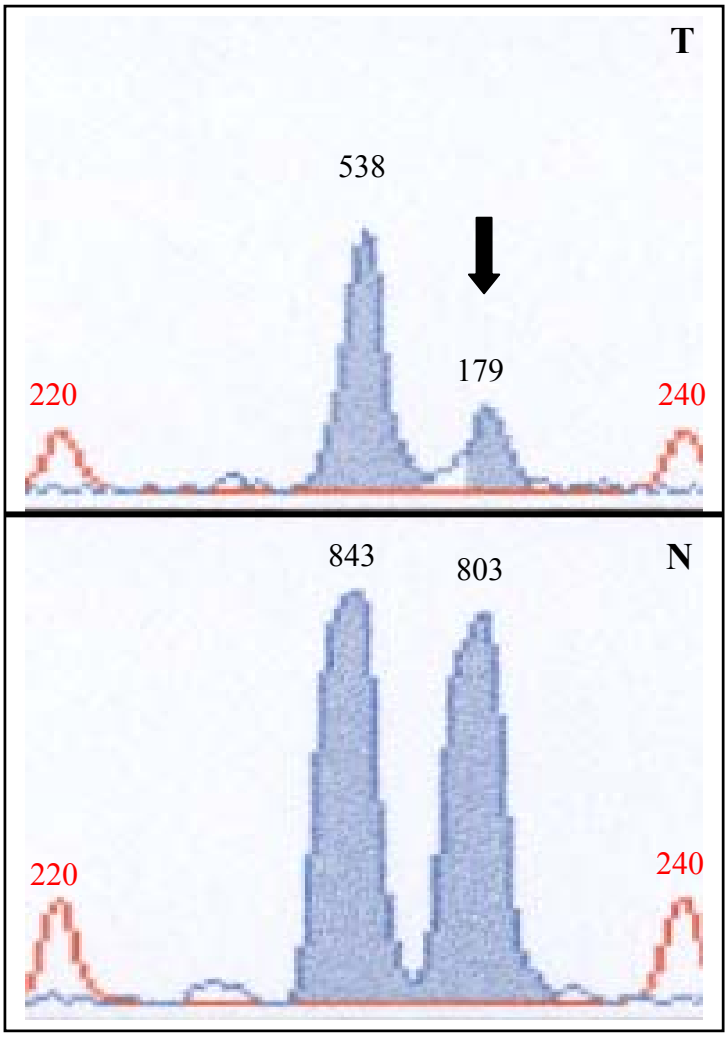
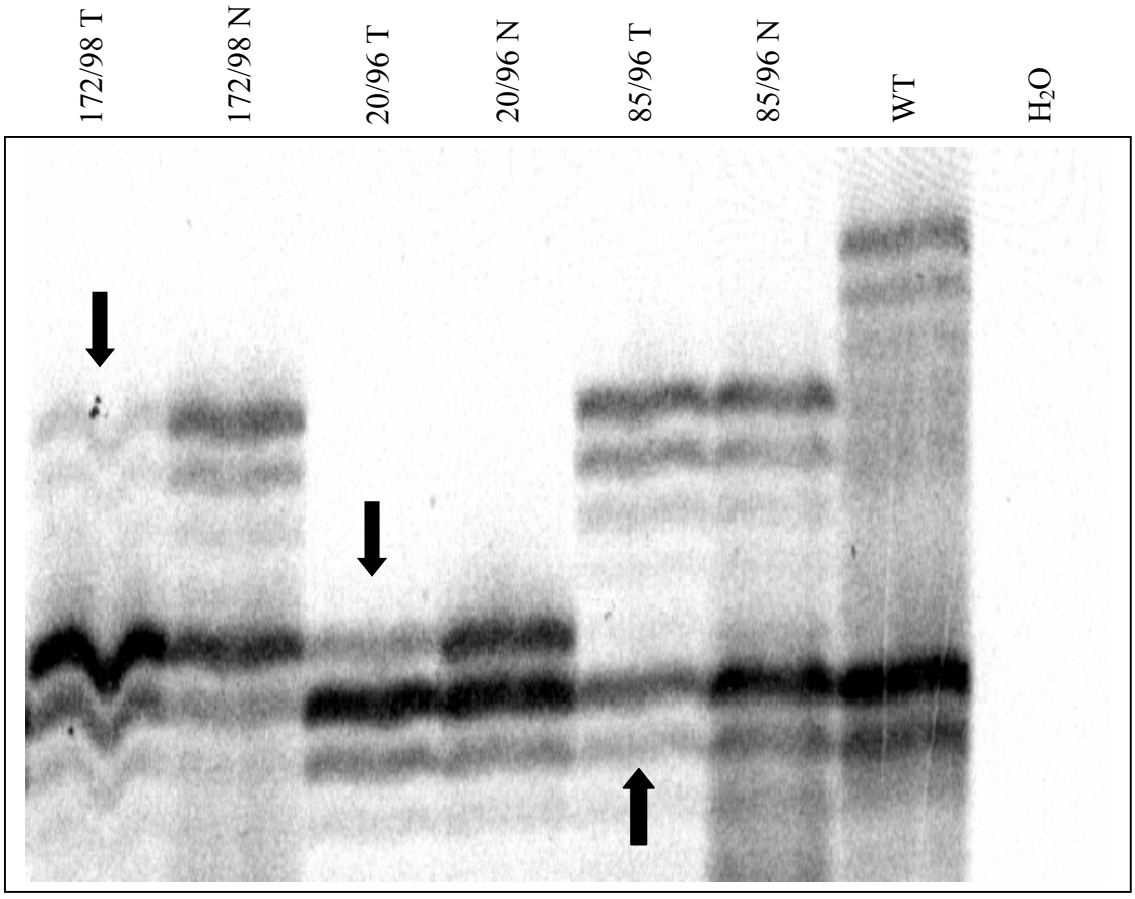


Abbildung 16:
Kurvendiagramm der LOH-Analyse von 162/98 im Chromosomalen Abschnitt des Markers D11S554
Hier ist LOH eindeutig in Form eines Verlustes der Peakhöhe in der Tumor DNA zu erkennen (Pfeil).
T= Tumor DNA,
N= Normal DNA,
rote Ziffern= Längenstandard,
schwarze Ziffern= Peakhöhe

Ebenfalls im Bereich 11p12-11p11 befindet sich D11S1361. Dieser Marker zeichnete sich in der Studie durch ein erhöhtes Vorkommen von nicht-informativer Patienten-DNA aus. Es waren 18 von 27 (67%) Tumoren nicht informativ, wobei 2 der 9 (22%) informativen Tumoren LOH aufwiesen. Es lag LOH bei einem informativen nicht-funktionellen NPT und bei einem informativen Vipom vor.

Abbildung 17 zeigt ein Polyacrylamidgel für den Marker D11S1361, mit den beiden NPTs mit LOH, sowie die Probe 85/96 als Beispiel für Retention der Heterozygotie.

Abbildung 17: Harnstoffgel der LOH-Analyse mit dem Mikrosatellitenmarker D11S1361

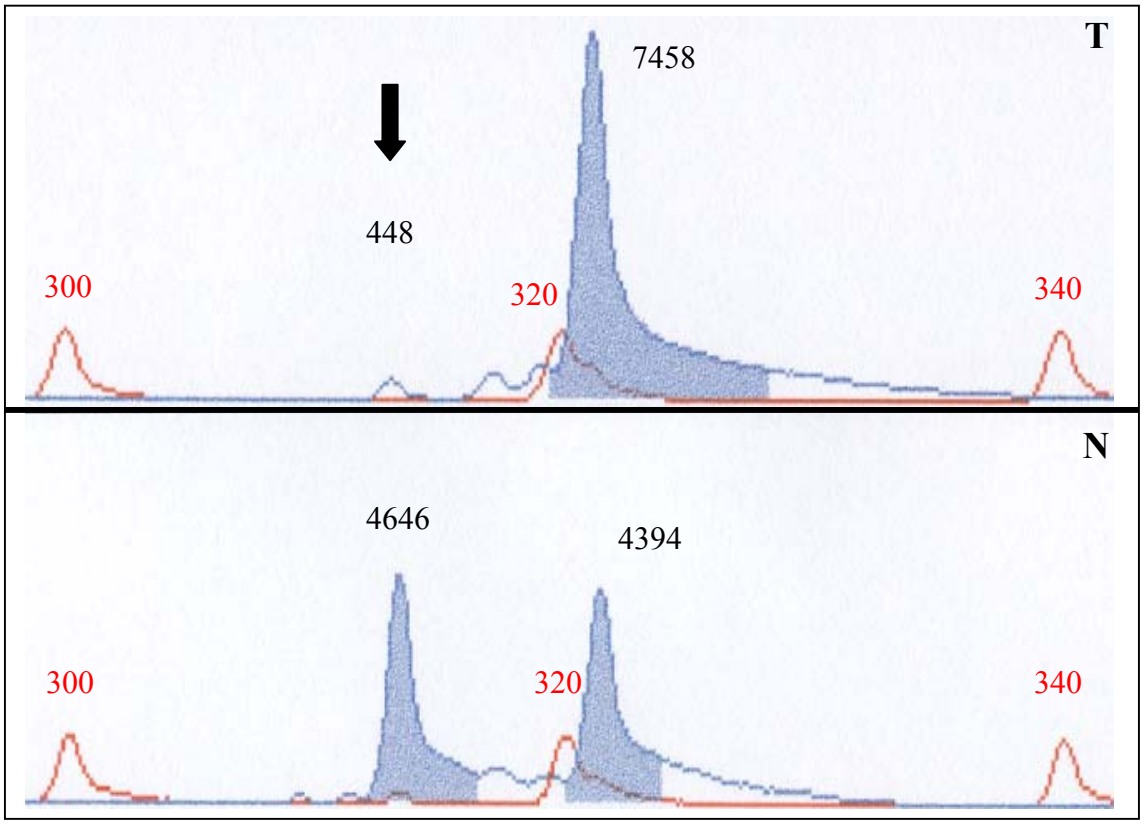


D11S1361 ist ein Mikrosatellitenmarker, der 208 bp lange PCR-Produkte zeigt. Auf diesem Harnstoffgel wurden die Patientenproben 172/98, 20/96 und 85/96 in Bezug zu einer Normalprobe dargestellt. 172/98 und 20/96 stellen deutlich den Allelverlust dar und 85/96 eine Retention von Heterozygotie (markiert durch Pfeile). Die Proben wurden im Vergleich zu einem Wildtyp und einer H_2O negativ-Kontrolle auf das Polyacrylamidgel aufgetragen.

Die höchste LOH-Rate zeigte die DNA-Region des Markers D11S1985 (11pter-11q13). Hier zeigten 10 von 23 informativen NPTs (43%) einen Verlust von Heterozygotie. 4 von 9 Insulinomen, 1 von 6 Gastrinomen, 1 Vipom und 4 von 7 nicht-funktionellen NPTs wiesen LOH auf.

Abbildung 18 zeigt exemplarisch LOH bei der Tumorprobe F11.

Abbildung 18: Beispiel eines Kurvendiagramms von D11S1985



In der Abbildung ist ein LOH im Bereich des Mikrosatellitenmarkers D11S1985 des Patienten F11 in Form eines Kurvendiagramms abgebildet. Der Wegfall des ersten Peaks zeigt LOH an, was sich nach der in Kapitel 5.3.2 beschriebenen Methode wie folgt berechnen läßt; 4394 : 4646 / 7458 : 448 = 0,06. Das Ergebnis ergibt einen Wert unter 0.5, was auf ein LOH hinweist.
T = Tumor DNA, N = Normal DNA, rote Ziffern = Längenstandard, schwarze Ziffern = Peakhöhe

Tabelle 17 gibt zusammenfassend die Ergebnisse der LOH-Analyse bezogen auf die informativen Tumoren des jeweiligen Mikrosatellitenmarkers wieder.

Tabelle 17: **Ergebnisse der LOH-Analyse**

D11S921	D11S930	D11S1324	D11S907	D11S1392	D11S995	D11S4200	D11S4148	D11S554	D11S1361	D11S1985
6/16	6/20	4/25	6/20	5/20	7/29	5/21	6/19	12/28	2/9	10/23
37%	30%	16%	30%	25%	24%	26%	31%	43%	22%	43%

Zeile 1 = LOH/ informative Patientenproben
Zeile 2 = Ergebnisse in Prozent

Tabelle 18 bietet einen Gesamtüberblick über die verwendeten Marker, ihre Lokalisation auf dem Chromosom 11p und die erhaltenen Ergebnisse.

Tabelle 18: **Ergebnisse der LOH-Analyse**

		D11S921	D11S930	D11S1324	D11S907	D11S1392	D11S995	D11S4200	D11S4148	D11S554	D11S1361	D11S1985		LOH/ informativem Tumor
Insulinome	101/98	▨	nd	○	nd	nd	○	nd	nd	○	nd	nd		0/ 3
	117/97	○	○	○	○	ni	○	○	○	○	○	○		0/ 10
	90	○	○	○	○	○	○	○	ni	○	○	○		0/ 10
	117	ni	○	○	○	○	○	ni	○	○	ni	○		0/ 8
	187/98	○	○	○	ni	○	○	ni	○	●	ni	○		1/ 8
	26/96	nd	ni	nd	nd	ni	○	nd	ni	nd	ni	●		1/ 2
	85/96	○	○	○	○	○	○	ni	○	○	○	●		1/ 10
	163/98	ni	●	○	●	○	○	●	●	○	ni	ni		4/ 8
	F11	●	●	ni	●	●	●	●	●	●	ni	●		9/ 9
	79/97	●	○	○	○	ni	○	○	●	●	○	●		4/ 10
	168/98	●	●	●	○	●	○	●	●	○	ni	○	★	6/ 10
Gastrinome	167/98	○	○	○	○	ni	○	○	ni	●	○	○		1/ 9
	177/98	ni	○	○	○	○	●	○	○	○	○	●		2/ 10
	164/98	ni	○	○	○	○	○	○	○	○	ni	○		0/ 9
	141/98	○	○	○	○	○	○	ni	○	○	ni	○		0/ 9
	F8ZR	ni	ni	○	●	○	○	○	ni	○	○	○	★	1/ 8
	74/96	nd	nd	○	ni	○	○	nd	nd	●	ni	○	★	1/ 5
Vipome	PJ	○	nd	○	nd	nd	○	nd	ni	○	nd	ni	★	0/ 4
	20/96	○	ni	●	ni	ni	●	○	ni	●	●	●	★	5/ 7
Reninom	122	○	○	○	ni	●	●	○	○	○	ni	ni	★	2/ 8
nicht-	53/96	●	●	●	●	ni	○	○	○	●	ni	ni		4/ 8
funktionelle	91	ni	ni	ni	○	ni	○	○	○	○	ni	○		0/ 6
NPTs	155/98	ni	ni	○	○	○	●	○	○	○	ni	○	—	1/ 8
	106	○	●	○	ni	○	○	○	nd	●	ni	●	★	3/ 8
	108	ni	○	○	ni	○	○	○	○	○	ni	○	★	0/ 8
	166/98	ni	○	○	○	○	○	●	○	●	ni	ni		2/ 8
	172/98	ni	●	○	○	○	●	○	ni	●	●	●	★	5/ 9
	179/98	●	ni	ni	●	●	○	○	●	●	ni	●	★	6/ 8
	162/98	●	○	●	●	●	●	●	●	●	ni	●	★	9/ 10

vertikal = Patientenproben
horizontal = eingesetzte Mikrosatellitenmarker
○ = Wildtyp
▨ = Mikrosatelliteninstabilität
● = LOH
ni = nicht informativ
nd = nicht untersucht
★ = maligner Tumor (bei Nachuntersuchung erkrankt)
— = kein Nachuntersuchungsergebnis vorliegend

5.2 Mutationsanalyse des Kandidatengens *WT1*

5.2.1 Single Strand Conformation Analysis (SSCA) und direkte DNA-Sequenzierung

In letzter Zeit haben sich einige Arbeitsgruppen mit der Bedeutung des *WT1*-Gens bei Ovarialtumoren (Pelletrier *et al.*, 1991; Viel *et al.*, 1992), bei Tumoren der Testes (Smith *et al.*, 1995), bei Harnblasentumoren (Shipman *et al.*, 1993), bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Sanchez-Cespedes *et al.*, 1997) und bei kindlichen Medulloblastomen (Yin *et al.*, 2001) auseinandergesetzt und die besondere Bedeutung dieses Chromosomenabschnitts postuliert. Unsere durchgeführte LOH-Analyse unter Einsatz von 4 verschiedenen Mikrosatellitenmarkern (D11S907, D11S1392, D11S995, D11S4200) zeigte in diesem Bereich LOH-Raten zwischen 24 und 30%. Aus diesen Gründen wurde eine Mutationsanalyse des *WT1*-Gens durchgeführt. Die Mutationsanalyse wurde auf die Exone 7-9 beschränkt, da in diesen „Hot Spot" Regionen mehr als 80% der *WT1-Gen* Mutationen bei anderen Tumoren gefunden wurden.

Zunächst wurde eine Vervielfältigung der bekannten Exon-Sequenzen (Exon 7/8/9) des *WT1*-Gens mit Hilfe einer PCR-Reaktion durchgeführt. Um diese Fragmente darstellbar zu machen, wurde radioaktiv markiertes Nukleotid (α-dCTP) bei einer PCR-Reaktion in die gebildeten DNA-Stränge eingebaut. Die PCR-Produkte wurden durch Gelelektrophorese in einem SSCA-Gel sichtbar gemacht und durch den direkten Vergleich der Banden von Patientenproben mit einer Kontrollprobe (Wildtyp) entsprechend in aberrant, bzw. konforme Bandenmuster unterteilt.

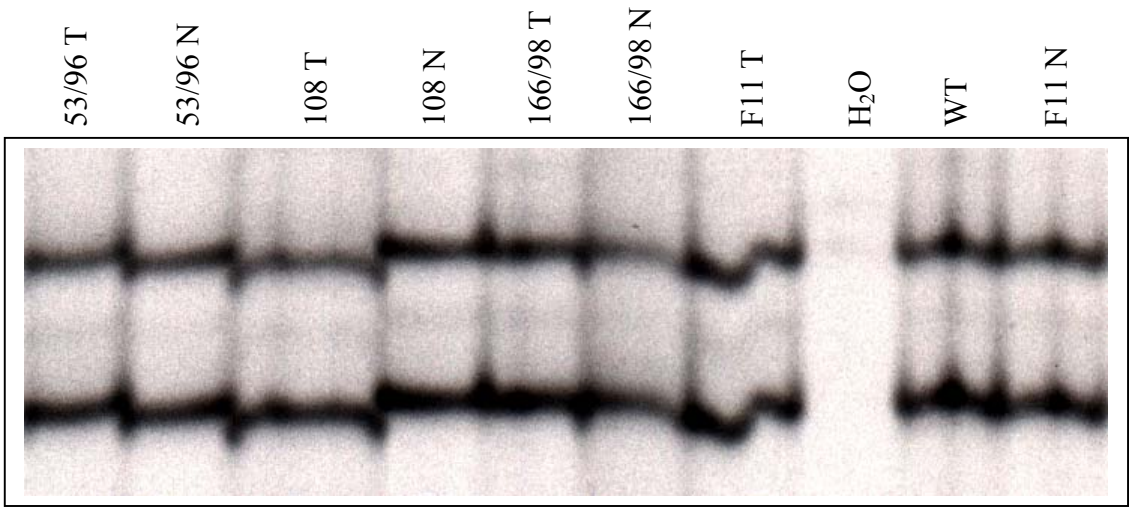
Für die endgültige Abklärung, ob es sich bei den gefundenen aberranten DNA-Banden um eine ursächliche Mutation handelte oder um eine mögliche DNA-Sequenzvariante, mussten ausführliche Sequenzanalysen durchgeführt werden. Dabei wurde die Methode der allelspezifischen Sequenzanalyse eingesetzt. Die aberranten Banden wurden aus dem Gel ausgestochen, die DNA eluiert und mit den im Methodenteil aufgeführten Techniken sequenziert.

Durch den direkten Vergleich zu einer mitgeführten Normalkontrolle wird eine Mutation ersichtlich. Es wurden immer mindestens zwei *Forward*- und *Reverse*-Sequenzanalysen aus unterschiedlichen PCR-Ansätzen mit den entsprechenden Primern durchgeführt, um eventuelle Einbaufehler der Taq DNA-Polymerase erkennen zu können.

Polymorphismen

Die SSCP von Exon 9 zeigte in allen 29 Tumoren Wildtypbanden (siehe beispielhaft Abb. 19).

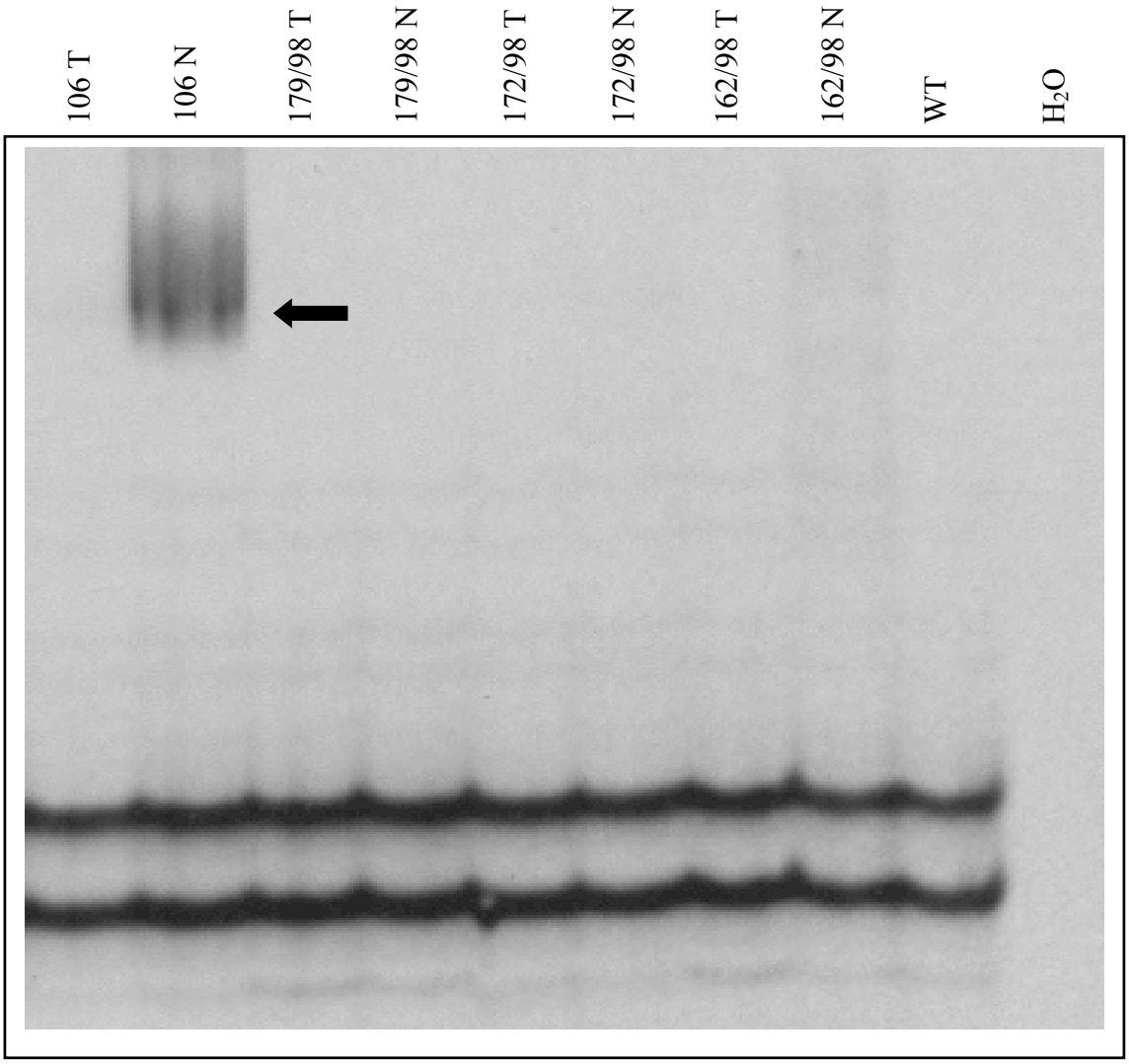
Abbildung 19: SSC-Analyse von Exon 9 innerhalb des WT1-Gens



Das vorliegende SSCA-Gel zeigt die verwendeten Proben 53/96, 108, 166/98 und F11 im Vergleich zu DNA von einem gesunden Patienten (Wildtyp). Es lagen bei der untersuchten Patienten DNA keine aberranten Banden vor.

Die SSCA von Exon 8 zeigte bei 4 von 29 NPTs gleiche abererrante Banden (Abb. 20). Die Sequenzierung dieser Banden ergab eine Insertion vor der 5´ Spleißstelle im nicht-kodierenden Bereich (Intron) vor der eigentlichen Exonsequenz.

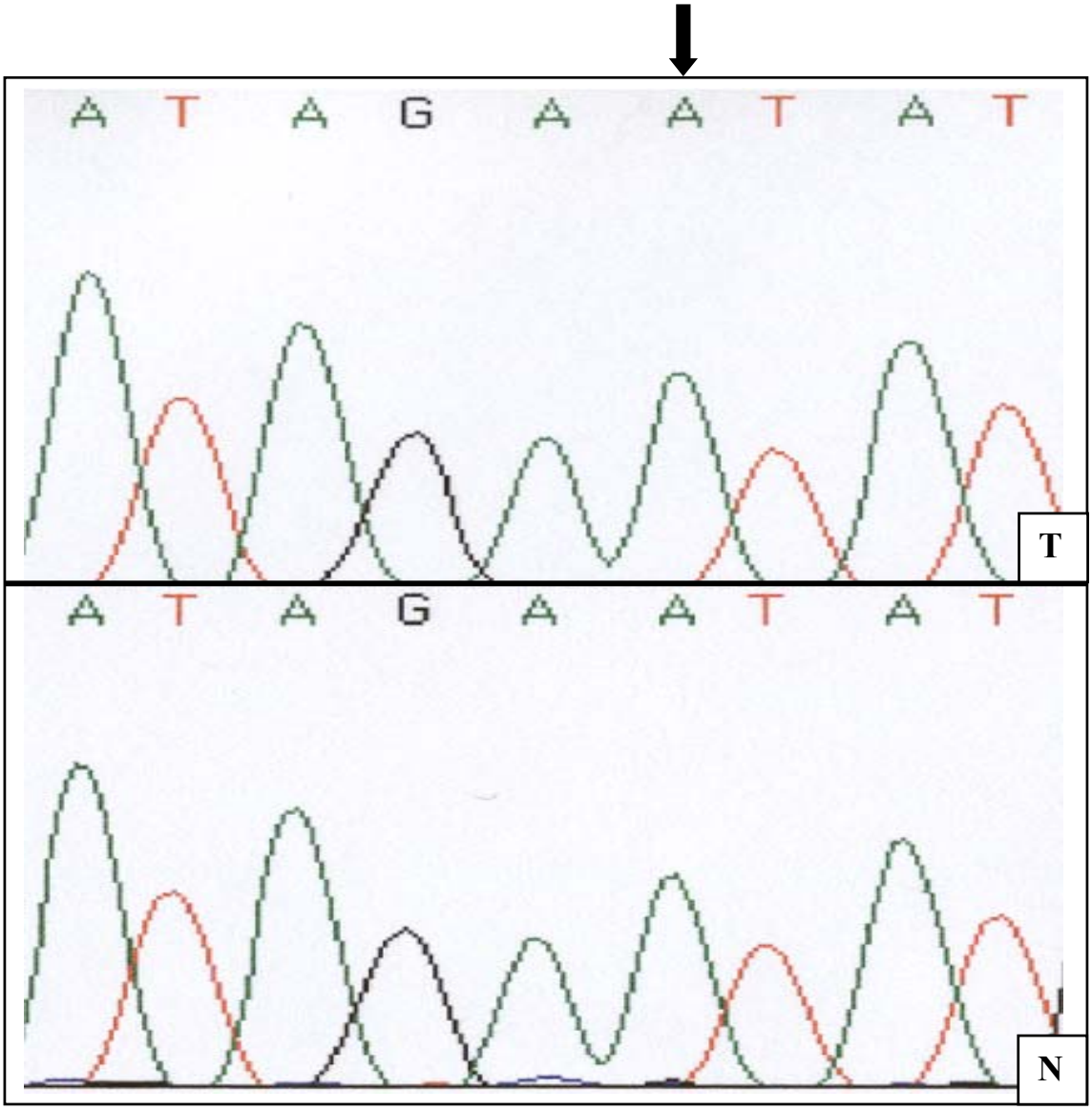
Abbildung 20: Darstellung eines SSCA-Gels von Exon 8 des *WT1*-Gens



In der Abbildung wurde beispielhaft ein SSCA-Gel von Exon 8 mit den Proben 106, 179/98, 172/98 und 162/98 zu einem Wildtyp und einer H_2O negativ-Kontrolle dargestellt. Die aberrante Bande in 106 N ist deutlich zu erkennen und mit einem Pfeil gekennzeichnet.

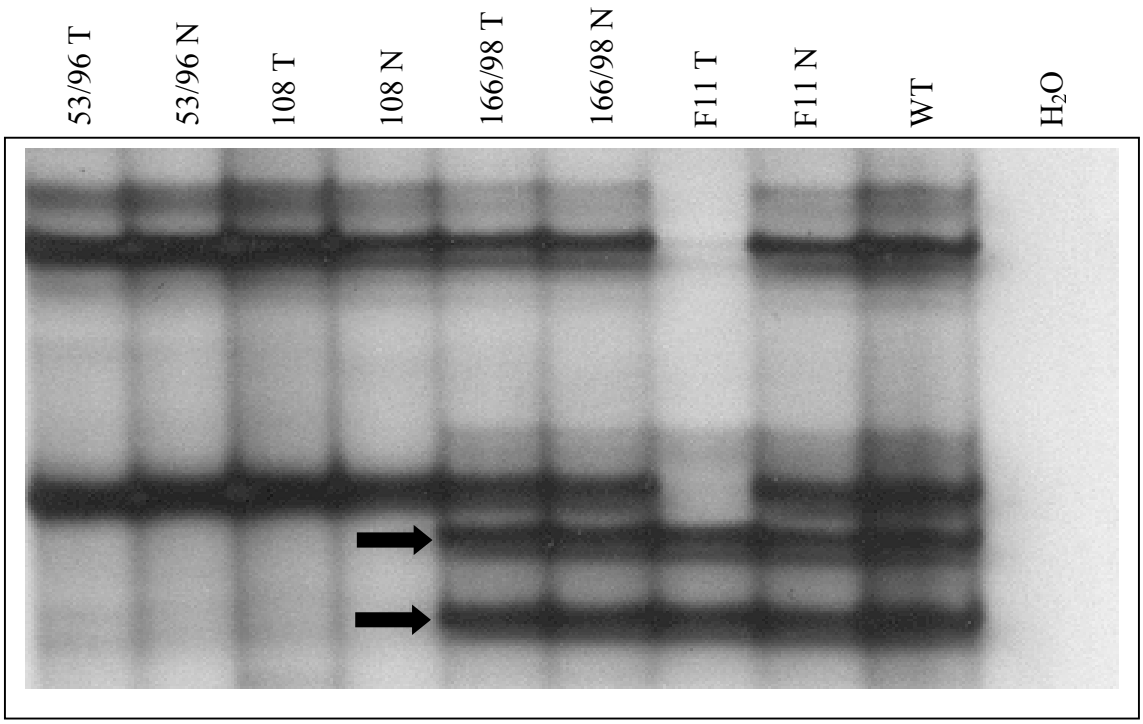
In der Sequenz wurde zwischen GAT die Insertion eines weiteren Adenin (A) festgestellt. Statt der Sequenzabfolge ...TAGATAT... erhielten wir ...TAGA**A**TAT... (siehe Abb. 21). Die orginale Aminosäuresequenz wurde also verändert, allerdings außerhalb der Exonsequenz, in der Intronsequenz. Interessanterweise zeigte sich die Veränderung in der Tumor DNA, wie auch in der Normal DNA bei allen 4 Patienten, die diese aberranten Banden zeigten, so dass es sich um einen Polymorphismus handelt.

Abbildung 21: **Sequenzanalyse von Exon 8**



Das Sequenzanalyse von Exon 8, Tumor 106, zeigte sowohl im Tumor, als auch in der Normal DNA des Patienten eine Insertion der Base Adenin (A), was hier durch einen Pfeil gekennzeichnet wurde.

Abbildung 22: Beispiel eines SSCA-Gels von Exon 7 des *WT1*-Gen



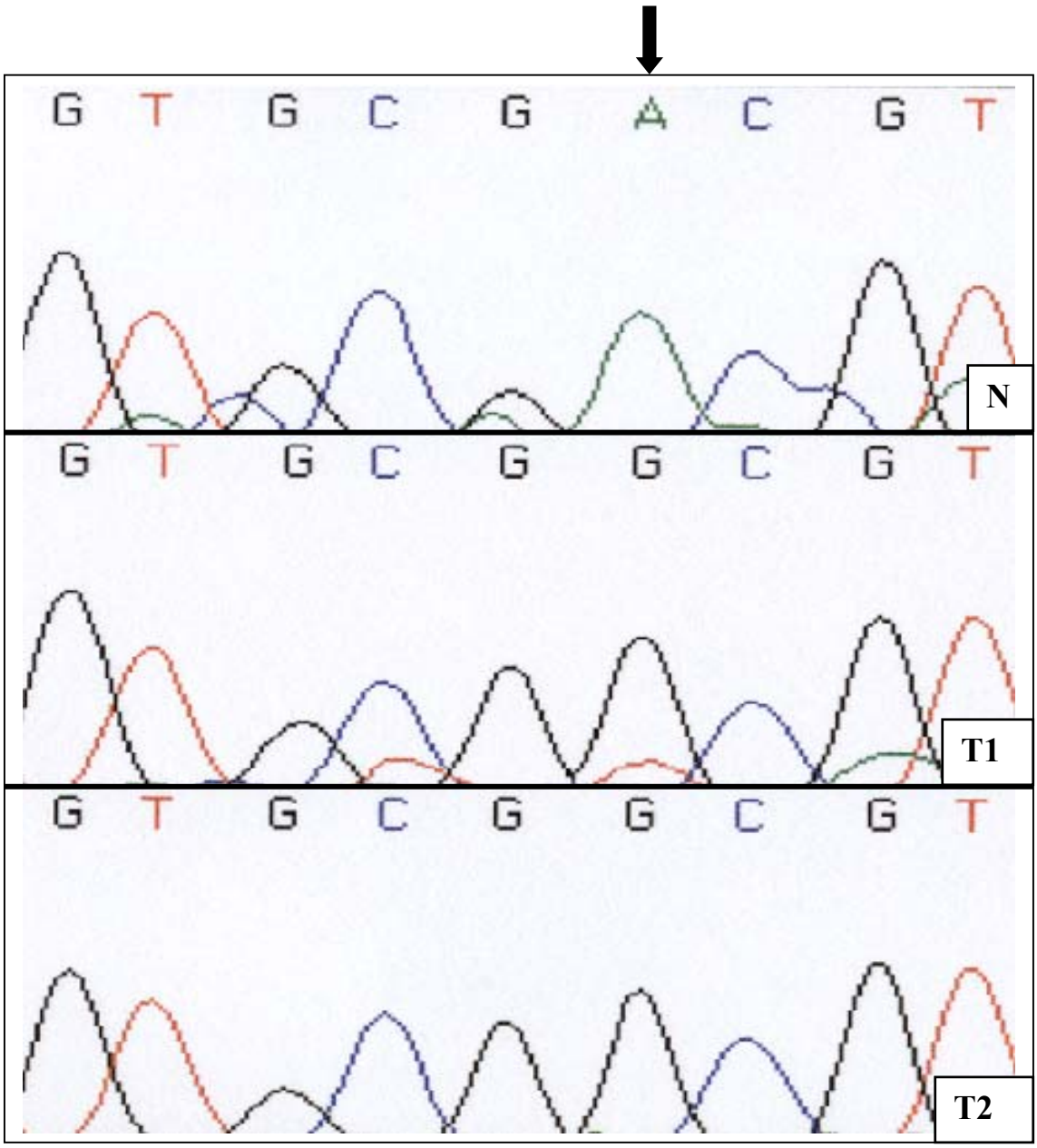
Die Proben 53/96, 108, 166/98 und F11 sind im Vergleich zu einem Wildtyp (gesunder Patient) dargestellt. Die aberranten Banden (Pfeile) finden sich, sowohl in den Patientenproben, als auch im Wildtyp.

Die SSCA von Exon 7 zeigten bei 10 von 29 Tumoren gleiche aberrante Banden. Interessanterweise zeigte sich diese Veränderung in der Basensequenz nicht nur bei den Patienten 85/96, 163/98, 90, 187/98, 177/98, F8ZR, 141/98, 172/98, 162/98, 166/98, sondern auch in der eingesetzten Kontroll DNA (WT) eines Gesunden. Der Patient F11 zeigte ein ausschließliches Vorkommen der aberranten Banden in der Tumor DNA (s. Abb. 22).

Die Sequenzierung ergab im dritten Triplett von Exon 7 an Position 71 der 353 Basen langen Sequenz und Position 8 der cDNA-Sequenz eine A $\Rightarrow$ G Transition, die allerdings keinerlei Auswirkungen auf der Proteinebene zur Folge hatte. Das entstandene Triplett CG**G** kodiert, ebenso wie in der Orginalsequenz, das Triplett CG**A,** für die Aminosäure Arginin (s. Abbildung 23).

Den entstandenen Abweichungen im Bandenmuster der SSCA von Exon 7 lag demnach eine sogenannte „stumme“ Mutation zugrunde, die einem Polymorphismus entspricht.

Abbildung 23: **Sequenzanalyse von Exon 7**



Die Sequenzanalyse zeigt den Basenaustausch von Adenin (A, hier in grün) in Guanin (G, hier in schwarz) bei F11 (Pfeil). N, stellt die normale DNA-Sequenz dar, T1 und T2 die Sequenzen der Tumor DNA, die innerhalb einer SSC-Analyse aberrante Banden zeigten (Abb. 21). Sowohl bei der Orginalsequenz mit Guanin, als auch bei der aberranten Sequenz mit Adenin entsteht in der Proteinsequenz die Aminosäure Arginin.

D.h. es wird in der Proteinsequenz durch den Basenaustauch keine Änderung hervorgerufen.

Somit wurde in keinem der NPTs weder ein Basenaustausch, der zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz oder gar zum Abbruch (Stoppmutation) derselben innerhalb einer Exonsequenz führte, noch leserasterverschiebende Deletionen oder Insertionen identifiziert.

5.2.2 Beziehung zwischen Allelverlust und Klinik

In unserer Arbeit wurden 29 NPTs (11 Insulinome, 6 Gastrinome, 2 Vipome, 1 Reninom und 9 nicht-funktionelle NPTs) von 29 Patienten untersucht. 19 Tumoren waren bösartig und waren bei Erstdiagnose bereits metastasiert, davon 9 in die Leber und 10 in Lymphknoten. 10 Tumoren, 8 Insulinome und 2 Gastrinome waren gutartig. Bei einer medianen Nachbeobachtung von berechneten 81 Monaten (Spannbreite 2 bis 141 Monate) lebten 17 Patienten ohne Zeichen der Erkrankung, 8 lebten mit der Erkrankung und 3 Patienten mit initial bereits diagnostizierten Lebermetastasen waren verstorben. 5 Patienten lebten mit der Erkrankung bei initialer Lebermetastasierung. 1 Patient war nach der Operation nicht mehr erkrankt.

Tabelle 19: **Klinisch-genetische Daten der 29 NPT Patienten, bei denen eine Alleltypisierung von Chromosom 11p durchgeführt wurde**

1. Teil						
Patient	**Alter bei Operation (Jahre)**	**Tumorart**	**Malignitäts-zeichen**	**Primärtumor Größe (mm)**	**Nachunter-suchung (Monate)**	**LOH/ inform. Marker auf 11p**
101/98	53	Insulinom	Keine	10x15	33; NED	0/3
117/97	79	Insulinom	Keine	10x10	30; NED	0/10
90	45	Insulinom	Keine	30x30	31; NED	0/10
117	49	Insulinom	Keine	15x22	19; NED	0/8
187/98	33	Insulinom	Keine	8x3	141; NED	1/8
26/96	56	Insulinom	Keine	18x14x14	48; NED	1/2
85/96	51	Insulinom	Keine	20x20	37; NED	1/10
163/98	62	Insulinom	IG	35x18	16; NED	4/8
F11	48	Insulinom/MEN1	Keine	40x30x20	82; NED	9/9

2. Teil						
Patient	**Alter bei Operation (Jahre)**	**Tumorart**	**Malignitäts-zeichen**	**Primärtumor Größe (mm)**	**Nachunter-suchung (Monate)**	**LOH/ inform. Marker auf 11p**
79/97	52	Insulinom	IG	25x22	38; NED	4/10
168/98	64	Insulinom	LN metastasen	80x60	130; AWD	6/10
167/98	50	Gastrinom	Keine	20x20	103; NED	1/9
177/98	57	Gastrinom	Keine	9x30x5	75; NED	2/10
164/98	58	Gastrinom	LN metastasen	5x6	73; NED	0/9
141/98	28	Gastrinom	LN metastasen	20x20	35; NED	0/9
F8ZR	32	Gastrinom/MEN1	LN metastasen	20x20	40; AWD	1/8
74/96	56	Gastrinom	Lebermetastasen	25x25	2; DOD	1/5
PJ	32	Vipom/MEN1	Lebermetastasen	n.b.	112; AWD	0/4
20/96	50	Vipom	Lebermetastasen	20x20	47; AWD	5/6
122	44	Reninom	Lebermetastasen	100x50x30	12; DOD	2/8
53/96	61	Nicht-funktionell	IG	35x35	42; NED	5/7
91	64	Nicht-funktionell	LN metastasen	35x35	30; NED	0/6
155/98	63	Nicht-funktionell	LN metastasen	100x100	Nicht erhalten	1/8
106	45	Nicht-funktionell	LN metastasen	70x80x50	49; AWD	3/8
108	62	Nicht-funktionell	Lebermetastasen	30x16	21; DOD	0/8
166/98	43	Nicht-funktionell	Lebermetastasen	26x26	168; NED	2/8
172/98	50	Nicht-funktionell	Lebermetastasen	31x31	64; AWD	5/9
179/98	53	Nicht-funktionell	Lebermetastasen	40x40	114; AWD	6/8
162/98	49	Nicht-funktionell	Lebermetastasen	200x200	82; AWD	9/10

LN, Lymphknoten; IG, infiltrating overgrowth = infiltratives Wachstum; NED, no evidence of disease = keine Anzeichen von Erkrankung, nach bis zu 3 Nachoperationen; AWD, alive with disease = mit Erkrankung lebend; DOD, dead of disease = durch die Erkrankung verstorben; LOH, Verlust von Heterozygosizität, n.b. = nicht bekannt

Insgesamt zeigten 78% (7/9) der Patienten mit in die Leber metastasierten NPTs, 57% (4/7) der Patienten mit in die Lymphknoten metastasierten NPTs LOH auf Chromosom 11p im Vergleich zu 60% (6/10) der Patienten mit nicht metastasierten NPTs, was statistisch nicht unterschiedlich war ($p>0$). Bei genauerer Betrachtung der Insulinome ist erwähnenswert, dass 6 der 8 benignen sporadischen Insulinome maximal ein LOH auf 11p aufwiesen, während die 3 malignen Insulinome mindestens 4 LOH (minimal

50% der untersuchten Marker) zeigten. Bezüglich der anderen NPT-Entitäten läßt sich aufgrund der kleinen Fallzahl keine Aussage machen.

Bei der Analyse von LOH auf 11p als prognostischem Marker, fällt auf, dass 10 von 17 Patienten (59%), die im Verlauf rezidiv und metastasenfrei waren, LOH aufweisen. 9 der 11 Patienten mit Rezidiven und Metastasen, bzw. welche an ihrer Erkrankung verstorben sind, zeigten LOH (82%). Dies ist tendenziell unterschiedlich.

6. Diskussion

LOH-Studien sind ein wirksames Instrument zur Feststellung der Bedeutung unterschiedlicher Gene bei der Entstehung von Tumoren des Menschen (Stanbridge *et al.*, 1990). Ebenso haben sie bei der Identifizierung von Tumorsuppressorgenen, wie dem Retinoblastom-Gen (Dryja *et al.*, 1986), dem Wilmstumor-Gen (Call *et al.*, 1990; Gessler *et al.*, 1990; Rose *et al.*, 1990), dem *DPC4/Smad4*-Gen (Hahn *et al.*, 1996a; Hahn *et al.*, 1996b) und dem *MEN1*-Gen (Chandrasekharappa *et al.*, 1997) eine bedeutende Rolle gespielt. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass 69% (20/29) der untersuchten NPTs mindestens in einem Bereich von Chromosom 11p LOH aufwiesen. Bei detaillierter Betrachtung zeigten 64% (7/11) der Insulinome, 67% (4/6) der Gastrinome, 78% (7/9) der nicht-funktionellen NPTs, sowie eins von 2 Vipomen und das Reninom LOH auf 11p (Tabelle 18).

In bereits veröffentlichten LOH-Studien wurden bis dato lediglich bis zu 5 unterschiedliche Chromosomenabschnitte von 11p untersucht (Tabelle 20). Um das Chromosom 11p erstmals kompletter zu analysieren, wurden deshalb in dieser Arbeit 12 verschiedene Mikrosatellitenmarker eingesetzt.

Tabelle 20: **Bisherige Veröffentlichungen zu Chromosom 11p**

Amplikon/ Genlokus	Mikrosatellitenmarker	Publikationen
11p15.5		
11p15.3	D11S902	Rigaud *et al.*, 2001
11p15.1	D11S921	Chung *et al.*, 1998
11p15		
11p14.3	D11S904	Rigaud *et al.*, 2001
11p14	D11S1324	Chung *et al.*, 1998
11p13-p15	CGH	Stumpf *et al.*, 2000
11p13	WT1	Chung *et al.*, 1998
11p11.2-p13		
11p11.2-p12	D11S554	Chung *et al.*, 1998
11p11		

CGH = „comparative genomic hybridisation"-Analysetechnik, *WT1* = Wilmstumorgen 1

Die Bereiche höchster LOH-Raten bei NPTs fanden wir zentromer auf Abschnitt 11p12-p11.2 (D11S554) und dem auf 11q übergreifenden Bereich von 11pter-11q13.5 (laut Genome Database v.a. im Bereich 11q12.1) (D11S1985). Ein hoher Verlust von Heterozygotie im Bereich des Mikrosatellitenmarkers D11S1985 (11pter-11q13.5), der im *MEN1*-Genlokus liegt, wurde bereits in der Arbeit von Hessman und seinen

Mitarbeitern für *MEN1*-assoziierte Pankreastumoren beschrieben (Hessman *et al.*, 2001). Die Gruppe stellte bei Material von allen untersuchten Tumoren (9/9; 100%) LOH fest. Allerdings wurde ein weiterer Tumor nicht untersucht und ein Anderer wurde als nicht-informativ gewertet (deshalb 94% LOH auf 11p und 92% LOH auf 11q). In dieser Arbeit wurde der Verlust von Heterozygotie für NPTs für diesen Mikrosatellitenmarker ebenfalls untersucht und ergab 43% (10/23). Wie auch bei dem untersuchten Pankreastumormaterial von Hessman, in dem eine *MEN1*-Assoziation vorausgesetzt wurde, konnte auch in dieser Arbeit eine Bedeutung der Region um den *MEN1*-Genlokus auf 11q13 bei sporadischen NPTs bestätigt werden. Demnach liegt die Vermutung nahe, dass Veränderungen des *MEN1*-Genlokus sowohl eine Rolle bei der Tumorgenese von *MEN1*-assoziierten, als auch von sporadischen NPTs spielen. Dies wurde inzwischen durch Mutationsanlaysen bestätigt (Zhuang *et. al.,* 1997; Gortz *et al.,* 1999; Hessman *et al.,* 1999; Guo *et al.,* 2002).

Von Chung und seinen Mitarbeitern wurde erstmals eine genomweite Alleltypisierung bei NPTs durchgeführt, die als erstes die mögliche Bedeutung von 11p bei der Tumorgenese von endokrinen Pankreastumoren beschrieb (Chung *et al.*, 1998). Diese Gruppe untersuchte unter anderem auch den Chromosomenabschnitt 11p11.2-p12 (D11S554) und stellte bei 8 von 27 informativen Tumoren (30%) LOH fest. In unserer Studie zeigten 43% (12/28) der NPTs im Bereich von D11S554 LOH. Demnach konnten die Ergebnisse von Chung bestätigt und sogar übertroffen werden (Chung *et al.*, 1998). Diese hohen LOH-Raten deuten darauf hin, dass sich in diesem Chromosomenabschnitt Gene befinden könnten, die für die Tumorgenese bedeutsam sein könnten. Dies wird vor allem auch dadurch gestützt, dass NPT´s durch ein relativ geringes „fractional allelic loss“ (FAL) von 0,12 charakterisiert sind (Chung *et al.*, 1998).

Im Bereich von D11S554 ist der *KAI1*-Genort lokalisiert (11p11.2), welcher erstmals von Dong und seinen Mitarbeitern 1995 mit Hilfe von PCR-Methoden in metastasierten Prostatatumoren isoliert wurde (Dong *et al.*, 1995), *KAI1* die Entstehung von Metastasen (Dong *et al.*, 1995) zu unterdrücken schien. Des Weiteren bemerkten Mashimo und seine Arbeitsgruppe, dass das Tumorsuppressorgen *p53* das *KAI1*-Gen durch eine Wechselwirkung mit dem vor *KAI1* liegenden Genabschnitt direkt aktiviert (Mashimo *et al.*, 1998). Bei der Untersuchung von Material von 177 Prostatatumoren wurde letztlich eine starke Korrelation zwischen der Aktivität von *p53* und *KAI1*, wobei eine Inaktivierung beider Gene mit einer schlechten Prognose assoiiert war (Mashimo *et*

al., 1998). Das Tumorsuppressorgen *p53*, was auf 17p13.1 lokalisiert ist, hat aber offensichtlich in der Tumorgenese der Adenokarzinome des Pankreas eine weitaus größere Bedeutung als bei der Genese der NPTs, da bei NPTs Veränderungen von p53 ein sehr seltenes Ereignis sind (Lee *et al.*, 1996; Tomita *et al.*, 1997; Fave *et al.*, 2001; Kamisawa *et al.*, 2002). Ob eine Funktionsänderung von *KAI1* in der Tumorgenese von NPTs ohne die Beteiligung von *p53* vorliegt, bleibt bis heute unbeantwortet. Bisher existieren lediglich Untersuchungen bei anderen Tumorentitäten, die sich mit dem *KAI1*-Genort befassen (Adachi *et al.*, 1996; Nakata *et al.*, 1998). So wurde bei Untersuchungen des *KAI1*-Gens von Guo und seinen Mitarbeitern bei metastasierten hepatozellulären Karzinomen signifikant weniger *KAI1* mRNA gemessen als bei gesunden Kontrollpersonen (Guo *et al.*, 1998). Ebenso scheint eine Korrelation zwischen der Produktion des *KAI1*-Proteins und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen bei oesophagealen squamös-zelligen Karzinomen vorzuliegen (Miyazaki *et al.*, 2000). In dieser Arbeit lag bei 9 von 12 NPTs mit LOH des Mikrosatellitenmarkers D11S554 eine Metastasierung vor. Hier ist somit auch eine starke Korrelation zwischen Metastasierung und LOH möglich, was jedoch aufgrund der geringen Fallzahl nicht zu prüfen ist. Angesichts der erstmals erkannten hohen LOH von 43% für die Region 11p12-p11.2 (D11S554) ist eine besondere Bedeutung des *KAI1*-Gens für die Tumorgenese von NPTs möglich, was jedoch durch eine direkte genetische Analyse des *KAI1*-Gens bei einer adäquaten Anzahl von NPTs geprüft werden muss.

Im Bereich um den Marker D11S554 (11p12-p11.2) sind weiterhin D11S4148 und D11S1361 lokalisiert. Nach der Genome Database liegt D11S4148 (11pter-11qter) telomer von 11p12. Dieser Bereich zeigte in 31% der informativen Tumoren (6/19) LOH. Der Mikrosatellitenmarker D11S1361 (11p12-p11) zeigte in 22% der informativen Tumoren (2/9) LOH, wobei die geringe Anzahl informativer Tumoren beachtet werden muss.

Hierbei muss aber berücksichtigt werden, dass die Lokalisation der Mikrosatelliten wie in Datenbanken angegeben (z.B. Genome Data Base) nur eingeschränkt genau ist, da nur eine ungefähre Position angegeben wird (www.gdb.org). Die Chromosomenabschnitte bestehen aus hochrepetetiven Sequenzen, die bekannterweise ganz spezifisch und variabel in jeder menschlichen DNA sind. Verständlicherweise kann es also in jedem Menschen leichte Variationen in der Lokalisation dieser Mikrosatellitenmarker geben. Aus diesem Grunde wird z.B. eine benachbarte Lage des

Mikrosatellitenmarkers D11S1361 und D11S554 von der Genome Data Base vorgeschlagen, muss aber nicht zwangsläufig darauf hinweisen, dass tatsächlich eine „direkte“ Nachbarschaftslage vorliegt.

Für die Marker D11S554 und D11S1361 auf Chromosom 11p zeigten NPTs ein LOH von 43, bzw. 22%. Beide Marker befinden sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum Tumorsuppressorgen *EXT2* (Wu *et al.*, 1994; Hecht *et al.*, 1995; Wuyts *et al.*, 1995). *EXT2* ist eins von 3 *EXT*-Genen, die mehr oder weniger grossen Einfluss auf die Tumorgenese von vererbbaren multiplen Exostosen der langen Knochen haben (Hecht *et al.*, 1995). Hecht vermutete 1995, dass die 3 Gene als Tumorsuppressorgene in einer mehrstufigen Tumorgenese fungieren (Hecht *et al.*, 1995; Rashkind *et al.*, 1995). Ob nun dem *EXT2*-Gen auch bei der NPT-Genese eine tumorsuppressive Funktion zukommt, ist zu diskutieren. Aufgrund des relativ hohen LOH v.a. für D11S554 erscheint eine genetische Analyse des *EXT2*-Gens bei NPTs in weiterführenden Arbeiten angezeigt.

Im Bereich 11p12-p11.2 befindet sich außerdem der Genort für *Islet-Brain1* (mitogen-aktivierte Proteinkinase 8-Interagierendes Protein 1), welcher auch als *MAPK8IP1*–Gen bezeichnet wird. Es gilt als einer der Schlüsselregulatorgene der β-Zellfunktion, wobei die Verantwortlichkeit für die Entstehung von Diabetes noch nicht eindeutig geklärt ist (Waeber *et al.*, 2000; Abderrahmani *et al.*, 2001). Bei Insulinomen kommt es bekanntlich zu einer Überproduktion von Insulin, ob der Einfluss von *MAPK8IP1* auf die β-Zellfunktion bei der Tumorgenese eine Rolle spielt, ist bis heute ebenfalls ungeklärt.

Bei einer genomweiten Alleltypisierung untersuchten Chung *et al.* außer dem Mikrosatellitenmarker D11S554 (11p11.2-p12), die Marker WT1 (11p13), D11S995 (11p13), D11S1324 (11p14), D11S921 (11p15.1) und fanden LOH in 30% (8/27), 31% (5/16), 35% (9/26), 31% (8/26) und 19% (3/16). In unserer Arbeit zeigten 29 NPTs in entsprechenden Bereichen folgende Ergebnisse für D11S554 in 43% (12/28) LOH, für D11S995 in 24% (7/29) LOH, für D11S1324 in 16% (4/25) LOH und für D11S921 in 37% (6/16) LOH. Für den Mikrosatellitenmarker WT1 konnten durch die Anwendung der Methode der radioaktiven Markierung lediglich nicht-informative Ergebnisse (Abb. 15) erhalten werden. Es fielen Unterschiede in beiden Arbeiten zwischen den Ergebnissen für die Marker D11S554, D11S995 und D11S1324 von 5-13% auf. Für den Mikrosatellitenmarker D11S921 war eine geringe Anzahl von NPTs (16) informativ, wodurch sich vermutlich die unterschiedlichen Ergebnisse von 37% (6/16) LOH und

19% (3/16) LOH erklären lassen. Durch den Einsatz von weiteren Mikrosatellitenmarkern in diesen interessanten Regionen wurde versucht, repräsentativere Ergebnisse zu erlangen. Es wurden im Bereich des *WT1-Gen*s, welches bereits als eventuell einflussnehmend auf die Tumorgenese beschrieben wurde, zusätzlich zum Marker D11SS995, D11S1392 und D11S907 eingesetzt (Chung *et al.*, 1998). Für alle drei Marker ergaben sich ähnliche Ergebnisse (24-30% LOH). D11S995 zeigte in 24% der informativen Tumoren LOH (7/29), D11S1392 in 25% (5/20) und D11S907 in 30% der informativen Fälle (6/20). Laut Genome DataBase scheint auch der Mikrosatellitenmarker D11S4200 (11pter-11qter) im Bereich 11p13 lokalisiert zu sein. Innerhalb dieses Chromosomenabschnitts zeigte sich in der vorliegenden Arbeit in 24% (5/21) LOH.

Der besondere Augenmerk der vorliegenden Arbeit richtete sich damit auf die Region um das *WT1-Gen*. Dies beruhte vor allem darauf, dass sich in letzter Zeit viele Arbeitsgruppen dem *WT1-Gen*s eine bedeutende Rolle bei der Tumorgenese verschiedener Tumoren, wie z.B. den Ovarialtumoren (Pelletrier *et al.*, 1991; Viel *et al.*, 1992), Tumoren der Testes (Smith *et al.*, 1995), Harnblasentumoren (Shipman *et al.*, 1993), nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Sanchez-Cespedes *et al.*, 1997) und dem kindlichen Medulloblastom (Yin *et al.*, 2001) zuschrieben (Tab. 3). Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit eine Sequenzierung der „Hotspot" Regionen in Exon 7, 8 und 9 des *WT1-Gens* vorgenommen. Hierbei konnten allerdings keine relevanten Mutationen, sondern nur zwei bekannte Polymorphismen (Kap. 6.2) identifiziert werden. Somit scheint das *WT1-Gen* bei der Tumorgenese der NPTs keine bedeutende Rolle zu spielen.

Der Mikrosatellitenmarker D11S1324 wurde in der von Chung und seinen Mitarbeitern durchgeführten Analyse von PETs analysiert und es wurde in 8 von 26 PET (31%) LOH festgestellt. In der vorliegenden Arbeit konnte diese LOH-Rate nicht bestätigt werden, da lediglich bei 16% (4/25) der informativen Tumoren LOH vorlag.

Telomer von diesem Marker befand sich der Mikrosatellitenmarker D11S930 mit LOH bei 6 von 20 informativen NPTs (30%). Stumpf untersuchte mit seinen Mitarbeitern mit Hilfe der *CGH* (*Comperative genomic hybridization*) ebenfalls diesen Chromosomenabschnitt 11p13-p15 und postulierte in 24% des untersuchten Tumormaterials von 25 Patienten mit NPTs DNA-Verluste (Stumpf *et al.*, 2000). Diese Angaben konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt und sogar übertroffen werden, was durch Anwendung der wesentlich empfindlicheren Technik für LOH-

Untersuchungen erklärt werden kann. Diese hohe LOH-Rate könnte auf Veränderungen des *E74-like Faktor 5*, (*ELF5)*-Gens und somit auf eine mögliche Bedeutung in der Tumorgenese von NPTs hindeuten. Das Gen aus der Familie der Transkriptionsfaktoren ist allgemein beteiligt an der Kontrolle der Zellproliferation und Tumorgenese, wobei bereits für unterschiedliche Tumoren LOH in diesem Chromosomenabschnitt gezeigt wurde (Sharrocks *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1998).

Die ebenfalls telomer gelegene Region 11p15.1 wurde auch von Chung und seinen Mitarbeitern analysiert. Er setzte dazu den Marker D11S921 ein und stellte bei 3 von 5 informativen Tumoren (60%) einen Allelverlust fest. In der Region dieses Markers fanden wir in 37% (6/16) LOH. Die Diskrepanz in den Ergebnissen kann auf die höhere Fallzahl in unserer Arbeit zurückzuführen sein. In einer LOH-Studie von Rigaud und seinen Mitarbeitern wurden angrenzende Regionen mit den Markern D11S904 (11p14.3) und D11S902 (11p15.3) untersucht. Die Arbeitsgruppe fand höhere LOH-Raten mit jeweils 50%. Allerdings bestand das Untersuchungsmaterial von Rigaud lediglich aus nicht-funktionellen endokrinen Pankreastumoren (Rigaud *et al.*, 2001). Dennoch bedarf die Region 11p15.1 mit einer LOH-Rate von 37% bis 50% näherer Betrachtung. D11S921 liegt in direkter Nachbarschaft zum Genlokus eines Sulfonylharnstoff-Rezeptors, welcher hohe β-Zellaffinität aufweist und einem Potassiumkanal-Gen. Beiden Genen wird ein Einfluß auf die phenotypische Ausbildung von persistierender Hyperinsulinämie und Hyperglykämie in der Kindheit (*PHHI* (Persistent Hyperinsulinemic Hyperglycemia of Infancy)) nachgesagt. Bei diesem Krankheitsbild kommt es zu einer Nesidioblastosis, also einer unkontrollierten Neubildung von Langerhans´schen Inselzellen im Pankreas (Aynsley-Green *et al.*, 1981; Glaser *et al.*, 1998). Eine ähnliche Pathogenese kann bei Insulinomen zugrunde liegen (Kap. 3.3.1). Allerdings unterscheiden sich die Insulinome mit einer LOH-Rate von 38% (3/8) nicht von den anderen NPTs mit einer LOH-Rate von 0% für Gastrinome und sogar 75% LOH (3 von 4) bei nicht-funktionellen NPTs. Somit scheint eine genetische Analyse des Genlokus, der vermutlich die Entstehung von PHHI beeinflusst, bei NPTs wünschenswert.

Obwohl die histologischen Eigenschaften von NPTs sich untereinander sehr ähneln, variiert die Malignitätsrate beträchtlich. Insulinome sind in 80% benigne, während Gastrinome und nicht-funktionelle NPTs in mindestens 50% maligne sind. Gegenwärtig gibt es keine histopathologische Einteilung, außer infiltrierendes Wachstum oder das Vorkommen von Metastasen, welches eine zuverlässige Unterscheidung zwischen

bösartigen und gutartigen Tumoren zulässt. Eine erhöhte Produktion von Chromogranin A, ein erhöhter Ki-67 Index oder TumorDNA-Sequenzänderungen werden als Indikatoren für bösartige Tumoren diskutiert, aber bis dato gibt es keinen Anhalt für einen einheitlichen bösartigen Phänotyp (Pelosi et al., 1996; Hessman et al., 1999; Hessman et al., 2001). In bis heute veröffentlichten Arbeiten wurde LOH auf Chromosom 1, 3p, 10q, 11q13 und 22q als mögliche Indikatoren für Malignität und Prognose von NPTs vorgeschlagen (Chung et al., 1997; Ebrahimi et al., 1999; Hessman et al., 1999; Perren et al., 2000; Wild et al., 2002). Allerdings wurde diese hypothetisch diagnostische und prognostische Bedeutung bisher nicht an größeren Patientenkollektiven bestätigt. LOH auf Chromosom 11p stellte in unserer klinisch-genetischen Analyse bei 29 NPTs keinen statistisch signifikanten prognostischen Marker dar. Nur 10 von 17 Patienten (59%), die im Verlauf rezidiv- und metastasenfrei waren, zeigten LOH, gegenüber 9 von 11 (82%) Patienten, die ein Rezidiv oder Metastasen erlitten ($p = 0,32$). Diese Tendenz, die hier mit einer kleinen Patientenzahl ersichtlich wurde, sollte durch weitere Studien mit höheren Fallzahlen genauer untersucht und bestenfalls bestätigt werden. Außerdem sind die in unserer Arbeit aufgezeigten hohen LOH-Raten in verschiedenen Abschnitten von Chromosom 11p, in mehreren Fällen in Einklang mit den Genloci für unterschiedliche Tumorsuppressorgene oder andere Kandidatengene zu bringen. Die Bedeutung dieser Gene, als auch ihr Einfluss auf die Tumorgenese der jeweiligen NPT- Entität bleibt ein interessantes Ziel weiterer Studien mit höheren Fallzahlen.

7. Zusammenfassung

Die molekularen Hintergründe bezüglich der Tumorgenese von Neuroendokrinen Pankreastumoren sind derzeit noch weitgehend ungeklärt. In mehreren Arbeiten wurde die Bedeutung einzelner Chromosomen untersucht. Frühere oberflächliche LOH-Untersuchungen von Chromosom 11p bei NPTs, ließen eine Bedeutung dieses Chromosoms in der Tumorgenese der Tumoren vermuten (Chung et al., 1998; Stumpf et al., 2000; Rigaud et al., 2001). Aus diesem Grunde wurde in der vorliegenden Arbeit eine Alleltypisierung von Chromosom 11p unter Einsatz von 12 unterschiedlichen Mikrosatellitenmarkern von 29 Patienten mit neuroendokrinen Pankreastumoren durchgeführt. Insgesamt zeigten 20 von 29 (69%) Tumoren mindestens ein LOH, wobei im Bereich des Markers D11S1985, der zentromer auf 11p liegt und bis 11q reicht, mit 43% die höchste LOH-Rate identifiziert wurde. In diesem Chromosomenabschnitt befindet sich der *MEN1*-Genlokus, dessen Bedeutung bei der Tumorgenese auch für sporadische NPTs inzwischen bestätigt wurde (Hessman et al., 2001). In der vorliegenden Studie wurden auf Chromosom 11p12-p11.2 und 11p15.1 Chromosomenabschnitte mit LOH-Raten von bis zu 43% identifiziert (D11S554, D11S921). In diesem chromosomalen Abschnitt sind mehrere bekannte Tumorsuppressorgene (KAI1, EXT2, Islet-brain1, E74-like Faktor5) lokalisiert, deren Einfluss auf die Tumorgenese in NPTs durchaus denkbar ist. Ebenfalls beträchtliche LOH-Raten von bis zu 30% wurden in der Region des *WT1-Gen*s (11p13) gefunden. Allerdings scheint das *WT1-Gen* keine wesentliche Rolle in der Tumorgenese der NPTs zu spielen, da wir in den „Hotspot"-Regionen keine Mutationen identifizieren konnten. Tendenziell zeigte sich ein prognostischer Wert von LOH auf Chromosom 11p. Bei 59% (10/17) der Patienten, die im Verlauf rezidiv- und metastasenfrei waren und bei 82% der Patienten, die Rezidive erlitten oder an der Erkrankung verstarben, wurde LOH festgestellt ($p = 0{,}32$).

Die vorliegende Studie liefert neue und bestätigende Hinweise darauf, dass einzelne Abschnitte von Chromosom 11p in die Tumorgenese der NPTs involviert sind. Es ist die Aufgabe in weiteren Studien die identifizierten Abschnitte mit den auf ihnen lokalisierten Kandidatengenen genetisch zu analysieren, um ihre Bedeutung für die Tumorgenese von NTPs klar zu definieren.

Zudem gilt es in weiterführenden Studien mit größerem Patientengut zu evaluieren, ob LOH auf Chromosom 11p einen prognostischen Marker darstellt.

8. Literaturverzeichnis

- Abraham SC, Wu TT, Klimstra DS, Finn LS, Lee JH, Yeo CJ, Cameron JL, Hruban RH (2001). Distinctive molecular genetic alterations in sporadic and familial adenomatous polyposis-associated pancreatoblastomas: frequent alterations in the APC/beta-catenin pathway and chromosome 11p. Am J Pathol, 159(5): 1619-27
- Abderrahmani A, Steinmann M, Plaisance V, Niederhauser G, Haefliger JA, Mooser V, Bonny C, Nicod P, Waeber G (2001). The transcriptional repressor REST determines the cell-specific expression of the human MAPK8IP1 gene encoding IB1 (JIP-1). Molec Cell Biol, 21: 7256-7627
- Adachi M, Taki T, Ieki Y, Huang CL, Higashiyama M, Miyake M (1996). Correlation of KAI1/CD82 gene expression with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer. Cancer Res, 56: 1751-55
- Al-Jehani RMA, Povey S, Delhanty JDA, Parrington JM (1995). Loss of Heterozygosity on Chromosome Arms 5q, 11p, 11q, 13q, and 16p in Human Testicular Germ Cell Tumors. Genes, Chromosomes and Cancer, 13: 249-56
- Andersen TI, Gaustad A, Ottestad L, Farrants GW, Nesland JM, Tveit KM, Borresen AL (1992). Genetic Alterations of the Tumor Suppressor Gene Regions 3p, 11p, 13p, 17p and 17q in Human Breast Carcinomas. Genes, Cromosomes and Cancer, 4: 113-21
- Arnold R, Simon B, Wied M (2000). Treatment of neuroendocrine GEP tumours in somatostatin analogues: a review. Digestion, 62 Suppl 1: 84-91
- Aynsley-Green A, Polak JM, Bloom SR, Gough MH, Keeling J, Ashcroft SJH, Turner RC, Baum JD (1981). Nesidioblastosis of the pancreas: definition of the syndrome and the management of the severe neonatal hyperinsulinaemic hypoglycaemia. Arch Dis Child, 56: 496-508
- Barghorn A, Speel EJ, Farspour B, Saremaslani P, Schmid S, Perren A, Roth J, Heitz PU, Komminoth P (2001). Putative tumor suppressor loci at 6q22 and 6q23-q24 are involved in the malignant progression of sporadic endocrine pancreatic tumors. Am J Pathol, 158(6): 1903-11
- Bartsch D, Hahn SA, Danishevski KD, Ramaswamy A, Bastian D, Galehdari H, Barth P, Schmiegel W, Simon B, Rothmund M (1999). Mutations of the DPC4/Smad4 gene in neuroendocrine pancreatic tumors. Oncogene, 18: 1-5

- Bartsch D, Kersting M, Schilling T, Ramaswamy A, Gerdes B, Bastian D, Schuermann M, Rothmund M (1998). $p16^{INK4a}$ alterations in gastrinomas and non-functioning islet cell carcinomas. Langenbecks Arch Chir I: 13-16
- Bartsch DK, Kersting M, Wild A, Ramaswamy A, Gerdes B, Schuermann M, Simon B, Rothmund M (2000). Low frequency of p 16(INK4a) alterations in insulinomas. Digestions, 62 (2-3): 171-7
- Beghelli S, Pelosi G, Zamboni G, Falconi M, Iacono C, Bordi C, Scarpa A (1998). Pancreatic endocrine tumours: evidence for a tumour suppressor pathogenesis and for a tumour suppressor gene on chromosome 17p. J Pathol, 186(1):41-50
- Beyer J (1983). Klinik und Diagnostik des Insulinoms, Chirurgie des endokrinen Pankreas. Kümmerle F, Rückert K (Hrsg.); Thieme: 44-53
- Bishop JM (1985). Viral Oncogenes. Cell 42: 23-38
- Bucher O (1980). Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 10. Auflage, Hans Huber Verlag, Bern
- Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A et al. (1990). Isolation and characterization of a zinc-finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms tumor locus. Cell, 60: 509-20
- Capella C, La Rosa S, Solcia E (1997). Criteria for malignancy in pancreatic endocrine tumors. Endocr Pathol, 8: 87-90
- Capella C, Polak JM, Buffa R, Tapia FJ, Heitz P, Usellini L, Bloom SR, Solcia E (1983). Morphologic patterns and diagnostic criteria of VIP-producing endocrine tumors. A histologic, histochemical, ultrastructural and biochemical study of 32 cases. Cancer, 52: 1860-74
- Cavanee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL (1983). Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. Nature 305: 779-784
- Chakrabarti R, Srivatsan ES, Wood TF, Eubanks PJ, Ebrahimi SA, Gatti RA, Passaro E, Sawicki MP (1998). Deletion mapping of endocrine tumors localizes a second tumor suppressor gene on chromosome band 11q13. Genes Chromosomes Cancer, 22(2): 130-7
- Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert-Buck MR, Debelenko LV, Zhuang Z *et al.* (1997). Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia type1. Science, 271: 350-53

- Chen YJ, Vortmeyer A, Zhuang Z, Gibril F, Jensen RT (2004). X-Chromosome Loss of Heterozygosity Frequently Occurs in Gastrinomas and is Correlated with Aggressive Tumor Growth. Cancer, 100(7): 1379-87
- Chung DC, Brown SB, Graeme-Cook F, Tillotson LG, Warshaw AL, Jensen RT, Arnold A (1998). Localization of putative tumor suppressor loci by genome-wide allelotyping in human pancreatic endicrine tumors. Cancer Res., 57: 3706-11
- Chung DC, Smith AP, Louis DN, Graeme-Cook F, Warshaw AL, Arnold A (1997). A novel pancreatic endocrine tumor suppressor gene locus on chromosome 3p with clinical prognostic implications. J Clin Invest, 100(2): 404-410
- Deveny CW, Deveny KE, Stark D, Moss A, Stein S, Way CW (1983). Resection of Gastrinomas. Ann Surg, 198: 546-553
- Dong JT, Lamb PW, Rinker-Schaeffer CW, Vukanovic J, Ichikawa T, Isaacs JT, Barrett JC (1995). KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. Science, 268: 884-86
- Donow C, Pipeleers-Marichal M, Stamm B, Heitz PU, Klöppel G (1990). Pathhologie des Insulinoms und Gastrinoms. Lokalisation, Größe, Multizentrität, Assoziation mit der multiplen endocrinen Neoplasie TypI und Malignität. Dtsch Med Wochenschr, 115: 1386-91
- Donow C, Pipeleers-Marichal MA, Schröder S, Stamm B, Heitz PU, Klöppel G (1991). Surgical pathology of gastrinoma. Site, size, multicentricity, association with multiple endocrine neoplasia type 1, and malignancy. Cancer, 68: 1329-1334
- Dryja TP, Friend S, Weinberg RA (1986). Genetic sequences that predispose to retinoblastoma and osteosarcoma. Symp Fundam Cancer Res, 39: 115-119
- Ebert MP, Hoffmann J, Schneider-Stock R, Kasper HU, Schulz HU, Lippert H, Roessner A, Malfertheiner P (1998). Analysis of K-ras gene mutations in rare pancreatic and ampullary tumours. Eur J Gastroenterol Hepatol 10: 1025-29
- Ebrahimi SA, Wang EH, Wu A, Schreck RR, Passaro E, Sawicki MP (1999). Deletion of chromosome 1 predicts prognosis in pancreatic endocrine tumors. Cancer Res, 59: 311-15
- Eckhauser FE, Cheung PS, Vinik AI, Strodel WE, Lloyd RV, Thompson NW (1986). Nonfunctioning malignant neuroendocrine tumors of the pancreas. Surgery, 100: 978-87

- El-Naggar AK, Hurr K, Huff V, Luna MA, Goepfert H, Batsakis JG (1996). Allelic loss and replication errors at microsatellite loci on chromosome 11p in head and neck squamous carcinoma: association with aggressive biological features. Clin Cancer Res, 2(5): 903-7
- Engelhardt D, Höfler H, Janetschek P, Roder JD, Petrides PE, Ritter M, Schusdzierra V, Stier A (1997). Neuroendokrine Tumoren des Gastrointestinaltraktes. Tumorzentrum München; www.krebsinfo.de
- Eriksson B, Arnberg H, Lindgren PG, Lorelius LE, Magnusson A, Lundqvist G, Skogseid B, Wide L, Wilander E, Oberg K (1990). Neuroendocrine pancreatic tumors: Clinical presentation, biochemical and histopathological findings in 84 patients. J Intern Med, 228: 103-13
- Eriksson B und Öberg K (1993). An update of the medical treatment of malignant endocrine pancreatic tumors. Acta Oncol, 32: 203-8
- Eriksson B und Öberg K (1999). Summing up 15 years of somatostain analog therapy in neuroendocrine tumors: future outlook
- Eriksson B und Öberg K (2000). Neuroendocrine tumours of the pancreas. Brit J Surg, 87: 129-31
- Eriksson B, Orlefors H, Sundin A, Westlin JE, Bergstrom M, Langstrom B, Oberg K (1998). [PET in neuroendocrine tumors.]. Nord Med, 113(9): 308-12
- Eubanks PJ, Sawicki MP, Samara GJ, Gatti R, Nakamura Y, Tsao D, Johnson C, Hurwitz M, Wan YJ, Passaro E (1994). Putative tumor-suppressor gene on chromosome 11 is important in sporadic endocrine tumor formation. Am J Surg, 167: 180-185
- Evers BM, Rady PL, Sandoval K, Arany I, Tyring SK, Sanchez RL, Nealon WH, Townsend CM et al. (1994). Gastrinomas demonstrate amlification of the HER-2/neu Proto-oncogene. Ann Surg, 219(6): 596-604
- Fave GD, Corleto VD (2001). Oncogenes, growth factors, receptor expression and proliferation markers in digestive neuroendocrine tumours. Acritical reappraisal. Ann Oncol, 12 Suppl 2, 13-17
- Fong KM, Zimmerman PV, Smith PJ (1994). Correlation of loss of heterozygosity at 11p with tumour progression and survival in non-small cell lung cancer. Genes, Chromosomes and Cancer, 10(3): 183-9

- Fujiwara T, Cai DW, Mukhopakhyay T, Grimm EA, Roth JA (1994). Therapeutic effect of a retroviral wild-type p53 expression vector in an orthtopic lung cancer model. J Natl cancer Inst (Bethesda), 86: 1458-62
- Gerald WL, Rosai J, Ladanyi M (1995). Characterization of the genomic breakpoint and chimeric transcripts in the EWS-WT1 gene fusion of desmoplastic small round cell tumor. Proc Nat Acad Sci, 92: 1028-32
- Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, Orkin SH, Bruns GA (1990). Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. Nature, 343: 774-778
- Glaser B, Thornton PS, Herold K, Stanley CA (1998). Clinical and molecular heterogeneity of familial hyperinsulinism. J Pediat, 133: 801-2
- Gorgone A, Calbo L, Melita G, Riso F, Tigano D, Barbuscia M (1999). Neuroendocrine tumors of the pancreas. Chir Ital, 51(4): 309-12
- Gortz B, Roth J, Krahenmann A, de Krijger RR, Muletta-Feurer S, Rutimann K, Saremaslani P, Speel EJ, Heitz PU, Komminoth P (1999). Mutations and allelic deletions of 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): 429-36
- Guo SS, Arora C, Shimoide AT, Sawicki MP (2002). Frequent deletion of chromosome 3 in malignant sporadic pancreatic endocrine tumors. Mol Cell Endocrinol 190(1-2): 109-114
- Guo SS, Wu AY, Sawicki MP (2002). Deletion of chromosome 1, but not Mutation of MEN-1, predicts prognosis in sporadic pancreatic endocrine tumors. World J Surg, 26: 843-847
- Guo XZ, Friess H, Di Mola FF, Heinicke JM, Abou-Shady M, Graber HU, Baer HU, Zimmermann A, Korc M, Buchler MW (1998). KAI1, a new metastasis suppressor gene, is reduced in metastatic hepatocellular carcinoma. Hepatology, 28: 1481-88
- Hahn SA, Hoque ATM, Moskaluk CA, Da Costa LT, Schutte M, Rozenblum E, Seymour AB, Weinstein CL, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1996a). Homozygous deletion map at 18q21.1 in pancreatic cancer. Cancer Res, 56: 490-94

- Hahn SA, Schutte M, Hoque ATM, Moskaluk CA, Da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1996b). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. Science, 271: 350-53
- Hansen MF, Cavenee WK (1987). Genetics of cancer predisposition. Cancer Res, 47(21): 5518-27
- Hecht JT, Hogue D, Strong LC, Hansen MF, Blanton SH, Wagner M (1995). Hereditary multiple exostosis and chondrosarcoma: linkage to chromosome 11 and loss of heterozygosity for EXT-linked markers on chromosomes 11 and 8. Am J Hum Genet, 56: 1125-31
- Hessman O, Lindberg D, Einarsson A, Lillhager P, Carling T, Grimelius L, Eriksson B, Kerstrom G, Westin G, Skogseid B (1999). Genetic alterations on 3p, 11p13, and 18q in nonfamilial and MEN1-associated pancreatic endocrine tumors. Genes Chromosomes Cancer, 26: 258-64
- Hessman O, Skogseid B, Westin G, Akerstrom G (2001). Multiple allelic deletions and intratumoral genetic heterogeneity in MEN1 pancreatic tumors. J Clin Endocrinol Metab, 86(3): 1355-61
- Hildebrandt F und Singh-Sawshney I (1999). “Polymerase-Chain-Reaction” aus Techniques in Molecular Medicine, Springer-Verlag
- Hirawake H, Taniwaki M, Tamura A, Amino H, Tomitsuka E, Kita K (1999). Characterization of the human SDHD gene encoding the small subunit of cytochrome b (cybS) in mitochondrial succinate-ubiquinone oxidoreductase. Biochim. Biophys Acta, 1412: 295-300
- Höfler H, Denk H, Lackinger E, Helleis G, Polak JM, Heitz PU (1986). Immunocytochemical demonstration of intermediate filament cytoskeleton proteins in human endocrine tissues and (neuro-) endocrine tumors. Virchows Arch Pathol Anat, 409: 609-26
- Howard TJ, Zinner MJ, Stabile BE, Passaro E (1990). Gastrinoma excision for cure. A prospective analysis. Ann Surg, 211: 9-14
- Huebner RJ und Todaro GJ (1969). Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. Proc Natl Acad Sci USA, 64 (3): 1087-94
- Isenberg JI, Walsh JH, Grossman MI (1973). Zpllinger-Ellison syndrome. Gastroenterology, 65: 140-65

- Jeanpierre C, Denamur E, Henry I, Cabanis MO, Luce S, Cecilie A, Elion J, Peuchmaur M, Loirat C, Niaudet P, Gubler MC, Junien C (1998). Identification of constitutional WT1 mutations, in patients with isolated diffuse mesangial sclerosis, and analysis of genotype/phenotype correlations by use of a computerized mutation database. Am J Hum Genet, 62: 824-33
- Jensen RT (1998). Management of Zollinger-Ellison syndrome in patients with multiple endocrine neuplasia type 1. J Intern Med, 243: 477-88
- Jensen RT (1999). Pancreatic endocrine tumors: recent advances. Ann Oncol, 10: 170-76
- Kahng YS, Lee YS, Kim BK, Park WS, Lee JY, Kang CS (2003). Loss of heterozygosity of chromosome 8p and 11p in dysplastic nodule and hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol Hepatol, 18: 430-6
- Kaji H, Canaff L, Lebrun JJ, Goltzman D, Hendy GN (2001). Inactivation of menin, a Smad3-interacting protein, blocks transforming growth factor type beta signaling. Proc Nat Acad Sci 98: 3837-42
- Kamisawa T, Tu Y, Egawa N, Ishiwata J, Tsuruta K, Okamoto A, Hayashi Y, Koike M, Yamaguchi T (2002). Ductal and acinar differentiation in pancreatic endocrine tumors. Dig Dis Sci, 47(10): 2254-61
- Kitamura Y, Shimizu K, Ito K, Tanaka S, Emi M (2001). Allelotyping of Follicular Thyroid Carcinoma: Frequent Allelic Losses in Chromosome Arms 7q, 11p, and 22q. J Clin Endocrinol & Metabol, 86(9): 4268-72
- Kitamura Y, Shimizu K, Tanaka S, Ito K, Emi M (2000). Allelotyping of anaplastic thyroid carcinoma: Frequent allelic losses on 1q, 9p, 11,17,19p, and 22q. Genes, Chromosomes and Cancer, 27(3): 244-51
- Klöppel G (2003). Tumoren des endokrinen Pankreas. Pathologe 24: 265-71
- Klöppel G, Höfler H, Heitz PU (1993). Pancreatic endocrine tumors in man. In: Polak JM (Hrsg.): Diagnostic histopathology of neuroendocrine tumors. Edinburgh, Churchill Livingstone: 91-121
- Klöppel G, Willemer S, Stamm B, Häcki WH, Heitz PU (1986). Pancreatic lesions and hormonal profile of pancreatic tumors in multiple endocrine neoplasia type 1. An immunocystochemical study of nine patients. Cancer, 57: 1824-32
- Knudson AG (1971). Mutations and cancer. Statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci, 68: 820

- Knudson AG, Strong LC (1972). Mutation and cancer: a model for Wilms tumor of the kidney. J Natl Cancer Inst, 48: 313-24
- Komminoth P, Heitz PU, Kloppel G (1998). Pathology of MEN-1: morphology, clinicopathologic correlations and tumour development. J Intern Med, 243(6): 455-64
- Lam KY et Lo CY (1998). Role of p53 tumor suppressor gene in pancreatic endocrine tumors of Chinese patients. Am J Gastroenterol 93: 1232-35
- Langer P, Bartsch D, Gerdes B, Schwetlick I, Wild A, Brehm B *et al.* (2002). renin producing neuroendocrine pancreatic carcinoma – a case report and review of the literature. Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes, 110: 43-49
- Langerhans P (1869). Dissertation in Berlin.
- La Rosa S, Sessa F, Capella C, Riva C, Leone B, Klersy C, Rindi G, Solcia E (1996). Prognostic criteria in nonfunctioning pancreatic endocrine tumours.Virchows Arch, 429: 323-33
- Lee CS (1996). Lack of p53 immunoreactivity in pancreatic endocrine tumors. Pathology, 28(2): 139-41
- Lescop S, Lellouch-Tubiana A, Vassal G, Besnard-Guerin C (1999). Molecular genetic studies of chromosome 11 and chromosome 22q DNA sequences in pediatric medulloblastomas. J Neuro-Oncol, 44: 119-27
- Lewin B (1998). Gene: Zellwachstum, Krebs und Entwicklung (VII). Spektrum Akad Verlag
- Madura JA, Cummings OW, Wiebke EA, Broadie TA, Goulet RL, Howard TJ (1997). Nonfunctioning islet cell tumors of the pancreas: a difficult diagnosis but one worth the effort. Am Surg, 63: 573-77
- Mashimo T, Watabe M, Hirota S, Hosobe S, Miura K, Tegtmeyer PJ, Rinker-Shaeffer CW, Watabe K (1998). The expression of the KAI1 gene, a tumor metastasis suppressor, is directly activated by p53. Proc Nat Acad Sci, 95: 11307-11
- Massa MJ, Iniesta P, Gonzalez-Quevedo R, De Juan C, Caldes T, Sanchez-Pernaute A, Cerdan J, Torres AJ, Balibrea JL, Benito M (1999). Differential prognosis of replication error phenotype and loss of heterozygosity in sporadic colorectal cancer. Eur J Cancer, 35(12): 1676-82
- McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR (1991). PCR-II: A practical Approach. Oxford University Press

- Meko JB und Norton JA (1994). Endocrine tumors of the pancreas. Curr Opin Gen Surg: 186-94
- Miracca EC, Yamamoto L, Contado D, De Souza Silva Takimoto M, Kowalski LP, Nagai MA (2000). Diagnostic Molecular Pathology, 9(4): 229-33
- Missiaglia E, Moore PS, Williamson J, Lemoine NR, Falconi M, Zamboni G, Scarpa A (2002). Sex chromosome anomalies in pancreatic endocrine tumors. Int J Cancer, 98(4): 532-8
- Miyazaki T, Kato H, Shitara Y, Yoshikawa M, Tajima K, Masuda N, Shouji H, Tsukada K, Nakajima T, Kuwano H (2000). Mutation and expression of the metastasis suppressor gene KAI1 in oesophageal squamous cell carcinoma. Cancer, 89: 955-62
- Moore PS, Orlandini S, Zamboni G, Capelli P, Rigaud G, Falconi M, Bassi C, Lemoine NR, Scarpa A (2001). Pancreatic tumours: molecular pathways implicated in ductal cancer are involved in ampullary but not in exocrine nonductal or endocrine tumorigenesis. Br J Cancer 84(2): 253-62
- Morowitz DA,Levine AE (1986). Malignant Zollinger-Ellison syndrome: Remission of primary and metastatic pancreatic tumor after gastrectomy: report of a case and review of the literature. Am J Gastroenterol, 81: 471-473
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Ehrlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 51 Pt 1: 263-73
- Muscarella P, Melvin WS, Fisher WE, Foor J, Ellison EC, Herman JG, Schirmer WJ, Hitchcock CL, DeYoung BR, Weghorst CM (1998). Genetic alterations in gastrinomas and nonfunctioning pancreatic endocrine tumors: analysis of p16/MTS1 tumor suppressor gene inactivation. Cancer Res, 58: 237-40
- Nakata T, Yoshimoto M, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Nakanura Y, Emi M (1998). Identification of a new commomly deleted region within a 2-cM interval of chromosome 11p11 in breast cancers. Eur J Cancer, 34(3): 417-21
- Nevins JR (1992). E2F: A link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. Science, 258: 424-29
- Newton CR und Graham A (1994). PCR. Spektrum akadem Verlag.
- Nikiforova MN, Nikiforov YE, Biddinger P, Gnepp DR, Grosembacher LA, Wajchenberg BL, Fagin JA, Cohen RM (1999). Frequent loss of heterozygosity at

chromosome 3p14.2-3p21 in human pancreatic islet cell tumours. Clin Endocrinol, 51: 27-33

- Öberg K (1999). Neuroendocrine gastrointestinal tumors-a condensed overview of diagnosis and treatment. Ann Oncol, 10 Suppl 2: 3-8
- Pagliaro LC, Antelmant D, Johnson DE, Machemert T, McCullough EA, Freireich EJ, Stass SA, Shepard HM et al. (1995). Recombinant human retinoblastoma protein inhibits cancer cell growth. Cell Growth Differ, 6: 673-80
- Patek CE, Little MH, Fleming S, Miles C, Charlieu JP, Clarke Ar, Miyagawa K, Christie S, Doig J, Harrison DJ, Porteous DJ, Brookes AJ, Hooper ML, Hastie ND (1999). A zinc finger truncation of murine WT1 results in the characteristic urogenital abnormalities of Denys-Drash syndrome. Proc Nat Acad Sci, 96: 2931-2936
- Pavelic K, Hrascan R, Kapitanovic S, Vranes Z, Cabrijan T, Spaventi S, Korsic M, Krizanac S, Li YQ, Stambrook P, Gluckman JL, Pavelic ZP (1996). Molecular genetics of malignant insulinoma. Anticancer Res. 16: 1707-17
- Pelletier J, Schalling M, Buckler AJ, Rogers A, Haber DA, Housman D (1991). Expression of the Wilms´ tumor gene WT1 in the murine urogenital system. Genes & Dev, 5: 1345-56
- Pelosi G, Bresaola E, Bogina G, Pasini F, Rodella S, Castelli P, Iacono C, Serio G, Zamboni G (1996). Endocrine tumors of the pancreas: Ki-67 immunoreactivity on paraffin sections is an independent predictor for malignancy: a comparative study with proliferating-cell nuclear antigen and progesterone receptor protein immunostaining, mitotic index, and other clinicopathologic variables. Hum Pathol, 27: 1124-34
- Perren A, Barghorn A, Schmid S, Saremaslani P, Roth J, Heitz PU, Komminoth P (2002). Absence of somatic SDHD mutations in sporadic neuroendocrine tumors and detection of two germline variants in paraganglioma patients. Oncogene, 21: 7605-7608
- Perren A, Komminoth P, Saremaslani P, Matter C, Feurer S, Lees JA, Heitz PU, Eng C (2000). Mutation and expression analyses reveal differential subcellular compartmentalization of PTEN in endocrine pancreatic tumors compared to normal islet cells. Am J Pathol, 157(4): 1097-103
- Raue F (1999). Multiple endokrine Neoplasie. Thiemes´ Innere Medizin, Georg Thieme Verlag

- Rigaud G, Missiaglia E, Moore PS, Zamboni G, Falconi M, Talamini G, Pesci A, Baron A *et al.* (2001). High resolution allelotype of nonfunctional pancreatic endocrine tumors: identification of two molecular subgroups with clinical implications. Cancer Res, 61(1): 285-92
- Rose EA, Glaser T, Jones C, Smith CL, Lewis WH, Call KM, Minden M, Champagne E, Bonetta L, Yeger H, Housman DE (1990). Complete physical map of the WAGR region of 11p13 localizes a candidate Wilms´ tumor gene. Cell, 60: 405-508
- Roth J, Klöppel G, Madsen OD, Storch MJ, Heitz PU (1992). Distribution patterns of proinsulin and insulin in human insulinomas: an Immunohistochemical analysis in 76 tumors. Virchows Arch Cell Pathol, 63: 51-61
- Rous FP, Murphey JB, Tytler WH, Lange LB, Robertson OH, Oliver J (1910). Observations on chicken tumors caused by filterable agents. J Exp Med and J Am Med Ass
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Pifarre A, Lopez-Cabrerizo MP, Barnadas A, Sanchez JJ, Lorenzo JC, Abad A, Monzo M, Navas-Palacios JJ (1997). Microsatellite alterations at 5q21, 11p13, and 11p15.5 do not predict survival in non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res, 3(7): 1229-35
- Schartl M (1998). Genetische Analyse der Entwicklung. Seyffert, Lehrbuch der Genetik, Gustav Fischer-Verlag
- Schiebler, Schmidt, Zilles *et al.* (1995). Anatomie. Springer-Verlag, 6.Auflage
- Schofield DE, Beckwith JB, Sklar J (1996). Loss of Heterozygosity at Chromosome Regions 22q11-12 and 11p15.5 in Renal Rhabdoid Tumors. Genes, Chromsomes and Cancer, 15: 10-17
- Serrano J, Goebel SU, Peghini PL, Lubensky IA, Gibril F, Jensen RT (2000). Alterations in the p 16 ^{INK4a}/CDKN2A Tumor Suppressor Gene in Gastrinomas. J Clin Endocrin. & Metabolism, 85: 4146-4156
- Service FJ, McMahon MM, O´Brien PC (1991). Functioning insulinoma incidence, recurence and long-term survival of patients. Mayo Clin Proc, 66: 711-9
- Sharrocks AD, Brown AL, Ling Y, Yates PR (1997). The ETS-domain transcription factor family. Int J Biochem Cell Biol, 29: 1371-1387

- Shaw ME et Knowles MA (1995). Deletion mapping of chromosome 11 in carcinoma of the bladder. Genes, Chromosomes and Cancer, 13(1): 1-8
- Shipman R, Schraml P, Colombi M, Raefle G, Ludwig CU (1993). Loss of Heterozygosity on chromosome 11p13 in primary bladder carcinoma. Hum Genet, 91: 455-58
- Siewert JR, Harder F, Rothmund M (2000). Kapitel 5 von Klöppel G. Endokrine Chirurgie: Praxis der Viszeralchirurgie, Springer-Verlag
- Simon R, Bürger H, Semjonow A, Hertle L, Terpe HJ, Böcker W (2000). Patterns of chromosomal imbalances in muscle invasive bladder cancer. Int J Oncol, 17: 1025-29
- Skandalakis JE, Gray SW, Rowe JS (1989). Anatomisch bedingte Komplikationen in der Allgemeinchirurgie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Skogseid B (1997). Multiple endocrine neoplasia type 1: clinical genetics and diagnosis. Arnold A, ed. Endocrine Neoplasms. Boston: Kluwer Academic Publishers; 383-406
- Smith RC et Rukstalis DB (1995). Frequent loss of heterozygosity at 11p loci in testicular cancer. The Journal of Urology, 153: 1684-87
- Speel EJ, Richter J, Moch H, Egenter C, Saremaslani P, Rutimann K, Zhao J, Barghorn A, Roth J, Heitz PU, Komminoth P (1999). Genetic differences in endocrine pancreatic tumor subtypes detected by comparative genomic hybridization. Am J Pathol, 155 (6): 1787-94
- Stanbridge EJ (1976). Suppression of malignancy in human cells. Nature, 260: 17-20
- Stanbridge und Nowell (1990). Origins of Human Cancer Revisted. Cell, Vol. 63: 867-74
- Stass SA, Mixson AJ (1997). Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. Therapeutic Implications. Clin Cancer Res, 3: 2687-95
- Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK (1976). DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. Nature 11; 260 (5547): 170-3.
- Stridsberg M, Hellman U, Wilander E, Lundqvist G, Hellsing K, Oberg K (1993). Fragments of chromogranin A are present in the urine of patients with carcinoid tumors: Development of a specific radioimmunoassay for chromogranin A and its fragments. J Endocrinol 139: 329-37

- Stumpf E, Aalto Y, Höög A, Kjellman M, Otonkoski T, Knuutila S, Andersson LC (2000). Chromosomal alterations in human pancreatic endocrine tumors. Genes, Chromosomes & Cancer, 29: 89-87
- Sugawa C, Walt AJ, Nunez DC, Masuyama H (1987). Pancreas divisum: Is it a normal anatomic variant? Am J Surg, 153: 62-66
- Tiling N, Ricke J, Wiedenmann B (2002). Neuroendokrine Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET). Klassifikation und Diagnostik. Internist Berlin, 43(2): 210-18
- Tomita T (1997). p53 and proliferating cell nuclear antigen in endocrine tumors of pancreas and intestinal carcinoids. Pathology, 29(2): 147-53
- Verner JV und Morrison AB (1958). Islet-cell tumor and a syndrome of refractery watery diarrhea hypokalemia. Am J Med, 25: 374-85
- Viel A, Giannini F, Tumiotto L, Sopracordevole F, Visentin M, Boiocchi M (1992). Chromosome localisation of two putative 11p oncosuppressor genes involved in human ovarian tumors. Br J Cancer, 66: 1030-36
- Waeber G, Delplanque J, Bonny C, Mooser V, Steinmann M, Widmann C, Maillard A, Miklossy J, Dina C, Hani EH, Vionnet N, Nicod P, Boutin P, Froguel P (2000). The gene MAPK8IP1, encoding islet-brain-1, is a candidate for type 2 diabetes. Nature Genet, 24: 291-295
- Weber HC, Venzon DJ, Lin JT, Fishbein VA, Orbuch M, Strader DB, Gibril F, Metz DC, Fraker DL, Norton JA, Jensen RT (1995). Determinants of metastatic rate and survival in patients with Zollinger-Ellison syndrome: a prospective long-term study. Gastroenterology, 108: 1637-49
- Weinberg RA (1989). Oncogenes, antioncogenes and the molecular bases of multistep carcinogenesis. Cancer Res , 49: 3713-21
- Weinberg RA (1991). Tumor suppressor genes. Science, 22; 254(5035): 1138-46
- Weinberg RA (1995). Molecular Basis of Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. Ann NY Acad Sci, 30; 758: 331-8
- Weinstein IB (1977). Growth factors, oncogenes and multistage carcinogenesis. J Cell Biochem, 33: 213-24
- Wermer P (1954). Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands. Am J Med, 16: 363-71

- Whipple AO (1942). present-day surgery of pancreas. New Engl J Med, 226: 515-20
- Whipple AO (1944). Hyperinsulinism in relation to pancreatic tumors. Surgery, 16: 289-96
- Wild A, Langer P, Ramaswamy A, Chaloupka B, Bartsch DK (2001). A novel insulinoma tumor suppressor gene locus on Chromosome 22q with potential prognostic implications. J Clin Endocrinol Metab, 86(12): 5782-7
- Wild A, Langer P, Celik I, Chaloupka B, Bartsch DK (2002). Chromosome 22q in pancreatic endocrine tumors: identification of a homozygous deletion and potenteial prognostic associations of allelic deletions. Eur J Endocrinol, 147: 507-13
- Wild A, Ramaswamy A, Langer P, Celik I, Fendrich V, Chaloupka B, Simon B, Bartsch DK (2003). Frequent methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene in pancreatic endocrine tumors. J Clin Endocrinol Metab, 88(3): 1367-73
- Wilder R, Allan FR, Power MH, Robertson HE (1927). Carcinoma of the islands of pancreas hyperinsulinism and hypoglycemia. J Am Med Assoc, 89: 348-55
- Wu YQ, Heutink P, De Vries BBA, Sandkuijl LA, Van den Ouweland AMW, Niermeijer MF, Galjaard H, Reyniers E, Willems PJ, Halley DJJ (1994). Assignment of a second locus for multiple exostoses to the pericentromeric region of chromosome 11. Hum Molec Genet, 3: 167-171
- Wündrich B, Kunze KD, Dehne A (1988). Maligenes Vipom des Caput pancreatis. Zent bl Chir, 113: 199-203
- Wuyts W, Ramlakhan S, Van Hul W, Hecht JT, Van den Ouweland AMW, Raskind WH, Hofstede FC, Reyniers E, Wells DE, De Vries B, Conrad EU, Hill A, Zalatayev D, Weissenbach J, Wagner MJ, Bakker E, Halley DJJ, Willems PJ (1995). Refinement of the multiple exostoses locus (EXT2) to a 3-cM interval on chromosome 11. Am J Hum Genet, 57: 382-387
- Yashiro T, Fulton N, Hara H, Yasuda K, Montag A, Yashiro N, Straus F, Ito K, Aiyoshi Y, Kaplan EL (1993). Comparison of mutations of ras oncogene in human pancreatic exocrine and endocrine tumors. Surgery, 114: 758-64
- Yin XL, Pang JC, Liu YH, Chong EY, Cheng Y, Poon WS, Ng HK (2001). Analysis of loss of heterozygosity on chromosomes 10q, 11, and 16 in medulloblastomas. J Neurosurg, 94(5): 799-805

- Yoshimoto K, Iwahana H, Fukuda A, Sano T, Katsuragi K, Kinoshita M, Saito S, Itakura M (1992). Ras mutations in endocrine tumors: mutation detection by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. Cancer Res., 83: 1057-62
- Yu F, Venzon DJ, Serrano J, Goebel SU, Doppman JL, Gibril F, Jensen RT (1999). Prospective study of the clinical course, prognostic factors and survival in patients with long-standing Zollinger-Ellison syndrome. J Clin Oncol 17: 615-630
- Zhou J, Ng AYN, Tymms MJ, Jermiin LS, Seth AK, Thomas RS, Kola I (1998). A novel transcription factor, ELF5, belongs to the ELF subfamily of ETS genes and maps to human chromosome 11p13-15, a region subject to LOH and rearrangement in human carcinoma cell lines. Oncogene, 17: 2719-2732
- Zhuang Z, Vortmeyer AO, Pack S, Huang S, Pham TA, Wang C, Park WS, Agarwal SK *et al.* (1997). Somatic mutations of the MEN1 tumor suppressor gene in sporadic gastrinomas and insulinomas Cancer Res., 57: 4682-4686
- Zollinger RM, Ellison EH (1955). Primary peptic ulcerations of the jejunum associated with islet cell tumors of the pancreas. Ann Surg, 294: 687-90

Internet-Quellen:

- OMIM und pubmed über www.ncbi.nlm.nih.gov
- Cancer genetics über www.cancergenetics.org
- Human genome data base über www.gdb.org
- Sanger-Institut über www.ensembl.org/Homosapiens/mapview?chr=11

9. Lebenslauf

Geboren am 03.02.1976 in Solingen

Schulbildung

1982-1986	Grundschule „Büscherhof“, Leichlingen
1986-1995	Gymnasium „August-Dicke-Schule“, Solingen
1995	Allgemeine Hochschulreife

Medizinische Ausbildung

1995	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Philipps-Universität, Marburg
1998	Ärztliche Vorprüfung - Physikum
1999	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2001	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2001	Studienortwechsel zum „Praktischen Jahr“ an die Universität Leipzig

Praktisches Jahr

10/ 01- 02/ 2002	« Hôpital Universitaire des Enfants » Brüssel, Belgien (Kinderheilkunde)
02 - 04/ 2002	Bezirksspital Breitenbach, Schweiz (Chirurgie)
04 - 05/ 2002	Waidspital Zürich, Schweiz (Chirurgie)
05 - 07/ 2002	Universitätsklinik Leipzig (Innere Medizin)
07 - 08/ 2002	Herzzentrum Leipzig (Innere Medizin)
2002	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Ärztin im Praktikum

08/2003 - 07/2004	Bernhard-Nocht-Institut (Tropeninstitut) Hamburg; Klinik des Bernhard-Nocht-Institutes unter Prof. Dr. med. G. Burchard

Assistenzärztin

ab 01.11.2004	Mathias-Spital Rheine; Abteilung für Allgemein- und Viszeralchirurgie unter Prof. Dr. med. M. Lausen

Sonstige Zusatzqualifikationen

2004	Dreimonatiger Tropenkurs am Bernhard-Nocht-Institut, Diplomabschluss

Solingen im März 2005

10. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. D. K. Bartsch für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des Themas und die engagierte Betreuung bei der Durchführung der Experimente, sowie die wertvollen Anregungen bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. Rothmund für sein Entgegenkommen, in seiner Klinik experimentell arbeiten zu können.

Frau Dr. A. Wild möchte ich für ihre sehr gute Betreuung und Anleitung bei der Planung und Durchführung von Experimenten danken. Ihr Motivation und ihr Vertrauen waren mir außerdem eine große Hilfe.

Weiterhin möchte ich Frau B. Chaloupka und Frau Y. Deiss für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente danken.

Mein größter Dank geht an meine „Mitstreiter“ um einen Doktortitel; Herrn Dr. S. A. Lang, ohne dessen Unterstützung diese Arbeit nur halb soviel Spaß gemacht hätte und natürlich auch Frau Dr. S. Fleischhacker.

Insgesamt möchte ich der gesamten Arbeitsgruppe danken, die sich für mich durch ein ausgezeichnetes Arbeitsklima und eine gute Zusammenarbeit auszeichnet.

Außerdem danke ich meiner Familie: Meiner Mutter, die mich beim Schreiben der Arbeit mit Leckereien verköstigt hat, meinem Vater, meiner Schwester Marlin, meinem Bruder Immo und meiner Schwester Rieke, die mich durch ihr Drängen zum Abschluss der Arbeit gebracht haben, sowie meiner Tante Snejana, deren Computerkenntnisse Gold wert sind.

11. Anhang

11.1 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Mikrosatellitenanalyse von Chromosom 11p mit Sequenzierung des Kandidatengens WT1 bei Neuroendokrinen Pankreastumoren“

in der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. M. Rothmund mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. D. K. Bartsch ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Dissertation vorgelegt.

Marburg im Juli 2005

11.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren

Arnold, Aumüller, Austermann, Barth, Bartsch, Basler, Bauhofer, Baum, Boudriot, Buchmann, Bührdel, Celik, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, Engenhardt-Cabillic, Engel, Feuser, Fruhstorfer, Gahr, Gemsa, Geus, Gotzen, Griss, Grzeschik, Hambrecht, Happle, Hasilik, Hellinger, Herzum, Hesse, Himmelmann, Hoffmann, Hofmann, Hörsch, Joseph, Kahn, Kaiser, Kern, Klenk, Kienapfel, Klose, Koch, Koolmann, Kottkamp, Krieg, Lang, Lennartz, Leppek, Löffler, Lorenz, Maisch, McGregor, Moll, Moosdorf, Mueller, Niederwieser, Oertel, Paschke, Petermann, Pfab, Pfeiffer, Radsak, Ramaswamy, Reichhardt, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Ruckert, Schachtschabel, Schäfer, Schmitt, Schneyer, Schuermann, Schuler, Schulz, Schurek, Spenker, Staehelin, Steiniger, Stief, Stiletto, Sturm, Vohland, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Werstermann, von Wichert, Wille, Wirth