

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Immunhistochemische Analyse der Expression von mTOR-Pfadweg-Komponenten
in Neuroendokrinen Tumoren des Magens

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Konstantin Griniak

aus Odessa

Datum der Promotion: 04.06.2021

Vorwort:

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht im „Journal of Clinical & Experimental Pathology“ unter der Publikation „Immunohistochemical Analysis of mTOR Pathway Expression in Gastric Neuroendocrine Tumors“ am 26. April 2014

Inhalt

| | | |
|--------|--|----|
| 0. | Abstract | 6 |
| 0.1. | Deutsch..... | 6 |
| 0.2. | Englisch..... | 7 |
| 1. | Einleitung | 8 |
| 1.1. | Neuroendokrine Tumoren des Magens | 8 |
| 1.1.1. | Unterteilung und Typisierung der Neuroendokrinen Tumore des Magens | 8 |
| 1.1.2. | Klassifikation der NET des Magens | 8 |
| 1.1.3. | Epidemiologie und Risikofaktoren der NET des Magens | 11 |
| 1.1.4. | Klinik, Diagnostik und Therapie..... | 12 |
| 1.2. | Der mTOR-Pfad | 16 |
| 1.2.1. | Allgemeine Grundlagen und Aufbau des mTOR-Pathways | 16 |
| 1.2.2. | Steuerung und Signalwege des mTOR-Pfads | 16 |
| 1.2.3. | Bedeutung des mTOR-Pfades | 18 |
| 1.2.4. | Pharmakologischer Einsatz von mTOR-Inhibitoren..... | 20 |
| 1.3. | Therapie von NETs des Magens und Zielsetzung der Arbeit..... | 21 |
| 2. | Methodik | 22 |
| 2.1. | Patientendaten | 22 |
| 2.2. | Statistischer Zusammenhang zwischen den einzelnen Komponenten | 23 |
| 2.3. | Einfluss verschiedener klinischer und pathologischer Faktoren | 23 |
| 2.4. | Statistische Auswertung | 24 |
| 2.5. | Histo-pathologische Aufarbeitung | 24 |
| 3. | Ergebnisse | 25 |
| 3.1. | Patientencharakteristika | 25 |
| 3.2. | Korrelationen der erhobenen Komponenten des mTOR-Pfads untereinander | 27 |
| 3.3. | Einfluss verschiedener klinischer Faktoren auf die Komponenten des m-TOR Pfadweges.. | 28 |
| 3.3.1. | Einfluss des Tumor-Gradings..... | 28 |
| 3.3.2. | Einfluss des Tumor-Typs | 29 |
| 3.3.3. | Einfluss des ENET-Stadiums..... | 30 |
| 3.3.4. | Einfluss des Vorhandenseins von Fernmetastasen | 31 |
| 3.3.5. | Einfluss der Höhe von Ki67 | 32 |
| 3.3.6. | Einfluss des Patientengeschlechts | 33 |
| 3.3.7. | Einfluss der Tumorlokalisation | 34 |
| 3.3.8. | Einfluss der Patientensymptomatik..... | 35 |
| 3.3.9. | Einfluss des klinischen Verlaufs im Follow-up..... | 36 |
| 4. | Diskussion..... | 37 |

| | |
|--|----|
| 4.1. Zusammenfassung..... | 37 |
| 4.2. Klinischer Kontext und Bedeutung der Einzelkomponenten..... | 37 |
| 4.3. Vergleich mit anderen aktuellen Studien..... | 40 |
| 4.4. Limitationen und Stärken unserer Arbeit | 41 |
| 4.5. Schlussfolgerung..... | 42 |
| 5. Anhang..... | 43 |
| 6. Literatur..... | 44 |
| 7. Eidesstattliche Versicherung | 49 |
| 8. Lebenslauf..... | 50 |
| 9. Publikationsliste | 52 |
| Originalarbeiten | 52 |
| 10. Dankessagung | 53 |

Tabellen und Abbildungsverzeichnis

Tabellen:

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Klassifikation der Magen NET nach WHO 2010 | 8 |
| Tabelle 2: Die Einteilung nach der TNM-Klassifikation | 9 |
| Tabelle 3: Allgemeine Charakteristika NETs des Magens | 11 |
| Tabelle 4: Charakteristika der Patienten in unserem Kollektiv | 25 |

Abbildungen:

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung des mTOR-Signalweges in Verbindung mit mTORC1 | 17 |
| Abbildung 2: Darstellung der Datenakquise im Rahmen einer retrospektiven Analyse | 22 |
| Abbildung 3: Ausprägung der Komponenten des mTOR-Pfades | 27 |
| Abbildung 4: Einfluss des Gradings auf die Komponenten des mTOR Pfades | 28 |
| Abbildung 5: Einfluss des Tumortyps auf die Komponenten des mTOR Pfades | 29 |
| Abbildung 6: Einfluss des ENET Stadiums auf die Komponenten des mTOR Pfades | 30 |
| Abbildung 7: Einfluss der Metastasierung auf die Komponenten des mTOR Pfades | 31 |
| Abbildung 8: Einfluss von Ki67 auf die Komponenten des mTOR Pfades | 32 |
| Abbildung 9: Einfluss des Geschlechts auf die Komponenten des mTOR Pfades | 33 |
| Abbildung 10: Einfluss der Tumorlokalisation auf die Komponenten des mTOR Pfades | 34 |
| Abbildung 11: Einfluss der Symptomatik auf die Komponenten des mTOR Pfades | 35 |
| Abbildung 12: Einfluss des Follow-ups auf die Komponenten des mTOR Pfades | 36 |

0. Abstract

0.1. Deutsch

Einleitung: Der “mammalian target of rapamycin” (mTOR) ist ein bedeutsamer Regulator der Zellproliferation und Proteintranslation. Bei einer Vielzahl von Malignomen ist mTOR hochreguliert. Die Expression von verschiedenen Komponenten des mTOR-Pfadweges in der sehr seltenen Gruppe der gastralen Neuroendokrinen Tumoren (NETs) ist bisher unklar und soll in der vorliegenden Arbeit analysiert werden.

Methodik: Die Expression von phosphoryliertem mTOR (p-mTOR), sowie vom “eukaryotic initiation factor 4E-Binding Protein 1” (p4E-BP1), “phospho-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha” (pPIK3CA), “phospho-protein kinase B” (p-Akt), “phospho-phosphatase and tensin homolog” (pPTEN) und “phosphotuberosus sclerosis 2” (pTSC2) wurde an 35 histopathologischen Proben von gastralen NETs untersucht. Die Daten wurden im Rahmen einer retrospektiven Analyse von Patienten mit einem gastralen NET zwischen 2007 und 2012 an der Charité erhoben.

Ergebnisse: Alle 35 Proben waren positiv für die mTOR-Komponenten pTSC2 und pPIK3CA, 34 Proben für pPTEN (93%), 31 Proben für p4E-BP1 (88%), 23 Proben für p-Akt (67%) und 31 Proben für p-mTOR (88%). Es zeigte sich ein starker linearer Zusammenhang zwischen p-mTOR und p4E-BP1 ($p < 0,001$, $R = 0,718$), und ein ebenfalls linearer, aber weniger starker Zusammenhang zwischen p-mTOR und pPTEN, sowie zwischen p4E-BP1 und pPTEN (jeweils $p = 0,004$ und $R = 0,477$). Mit zunehmender Entdifferenzierung (Grading I-III) nahm die Positivität von p-mTOR ($p = 0,043$) und pPTEN ($p = 0,019$) ab. Ein höherer Tumor-Typ (von 1-4) war durch eine Abnahme der Positivität von p4E-BP1 ($p = 0,041$) und pPTEN ($p = 0,046$) gekennzeichnet. Mit zunehmendem ENETS-Stadium (von 0-IV) zeigte sich eine Abnahme der Positivität von p4E-BP1 ($p = 0,002$). Eine Fernmetastasierung war mit einer signifikant höheren Positivität von p4E-BP1 vergesellschaftet ($p = 0,044$). Patienten mit höherem Ki67%-Index zeigten eine verminderte Positivität von pPTEN ($p = 0,044$). Weibliche Patienten hatten eine stärkere Positivität von p4E-BP1 im Vergleich zu männlichen Patienten ($p = 0,035$). pPTEN war schwach positiv bei den bereits verstorbenen Patienten ($p = 0,002$). Die summierte Gesamtkomponentenanzahl zeigte eine Abnahme bei zunehmendem Grading ($p = 0,0466$), einem höheren ENETS-Stadium ($p = 0,057$), einer bereits eingetretenen Fernmetastasierung ($p = 0,023$) und bei männlichen Patienten ($p = 0,037$).

Schlussfolgerung: Zusammenfassend zeigte sich in unserem Patientenkollektiv eine hohe Aktivierung von mTOR in gastralen NETs. Hieraus lässt sich ableiten, dass pharmakologische mTOR-Inhibition eine mögliche therapeutische Strategie in der Behandlung von gastralen NETs darstellen kann.

0.2. Englisch

Background: The mammalian target of rapamycin (mTOR) is an important regulator of cell proliferation and protein translation and is activated in various malignancies. Expression of mTOR cascade components in gastric neuroendocrine tumors (NETs), however, has not yet been fully explored.

Aims: The goal of the present study was to assess the activation of mTOR and its upstream and downstream components in the rare group of gastric NETs using immunohistochemistry and to investigate the relationship between expression and clinicopathological data.

Methods: The expression of phosphorylated mTOR (p-mTOR) and its major target the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1 (p4E-BP1), phospho-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha (pPIK3CA), phospho-protein kinase B (p-Akt), phospho-phosphatase and tensin homolog (pPTEN), and phosphotuberos sclerosis 2 (pTSC2) were examined in a series of 35 gastric NETs. The data has been gathered through retrospective analysis from patients at the Charité, which have been diagnosed with gastric NET during a period between 2007 and 2012.

Results: All samples from the 35 patients showed expression of the mTOR pathway components pTSC2 and pPIK3CA, 34 were positive for pPTEN (93%), 31 were positive for p4E-BP1 (88%), 23 were positive for p-Akt (67%) and 31 were positive for p-mTOR (88%). We identified a strong linear correlation between p-mTOR and p4E-BP1 ($p < 0,001$, $R = 0,718$), and a linear, but weaker correlation between p-mTOR und pPTEN, as well as between p4E-BP1 and pPTEN ($p = 0,004$ and $R = 0,477$, respectively). Less differentiated tumors resulting in a higher grading (I-III) showed reduced manifestation of p-mTOR ($p = 0,043$) and pPTEN ($p = 0,019$). An increasing tumor type (von 1-4) showed a decline in positivity regarding the manifestation of p4E-BP1 ($p = 0,041$) and pPTEN ($p = 0,046$). With increasing ENETS stage (0-IV) the manifestation of p4E-BP1 was reduced ($p = 0,002$). The presence of distant metastases showed a significantly higher positivity with the manifestation of p4E-BP1 ($p = 0,044$). Patients with higher Ki67% index showed reduced manifestation of pPTEN ($p = 0,044$). p4E-BP1 was higher in female than in male patients ($p = 0,035$). pPTEN was less positive in patients who already had died during the follow-up ($p = 0,002$). The sum of all 6 components was reduced with increasing grading ($p = 0,0466$), higher ENETS stage ($p = 0,057$), the presence of distant metastases ($p = 0,023$) and in male patients ($p = 0,037$).

Conclusions: In conclusion, these data demonstrate high mTOR activation in gastric NETs, suggesting that mTOR pathway inhibition may be a possible therapeutic strategy for treatment of gastric NETs.

1. Einleitung

1.1. Neuroendokrine Tumoren des Magens

1.1.1. Unterteilung und Typisierung der Neuroendokrinen Tumore des Magens

Unter Neuroendokrinen Tumoren versteht man zelluläre Neoplasien des diffusen neuroendokrinen Systems (DNES). Die Zellen des DNES entwickeln sich aus dem Neuro-Ektoderm. Daher ähneln diese Zellen hinsichtlich ihrer Eigenschaften Nervenzellen, in ihrer Funktion zählen sie jedoch zu Drüsen mit endokriner Aktivität. Dabei sind diese Zellen jedoch nicht etwa Teil eines endokrin aktiven Parenchyms des entsprechenden Organs, sondern befinden sich in Epithelien von Organen, die sich bezüglich ihrer endokrinen Eigenschaften sehr unterschiedlich darstellen können. Das Spektrum reicht von ausgeprägter endokriner Aktivität bis hin zum völligen Fehlen jeglicher endokrinen Aktivität. So gehören beispielsweise die in der Schilddrüse gelegenen C-Zellen zum DNES, stehen jedoch mit der eigentlichen endokrinen Aktivität der Schilddrüse nicht in Verbindung. Der Magen wiederum, der nicht zu den endokrinen Organen zählt, beherbergt in seiner Schleimhaut unter anderem die G-Zellen, endokrin aktive Zellen, die nicht zum eigentlichen Magenparenchym gehören. Durch verschiedene Auslöser und Ursachen kann es zu einer unkontrollierten Vermehrung neuroendokriner Zellen kommen. Prinzipiell ist hiervon jedes Organ betroffen, in dem sich neuroendokrine Zellen befinden. Zu den besonders häufigen Organmanifestationen zählen jedoch die kleinzelligen Bronchiolarkarzinome der Lunge, sowie Neoplasien des Magen-Darm-Traktes einschließlich der Pankreas. Insgesamt sind ca. 75% aller neuroendokrinen Neoplasien gastroenteropankreatischen Ursprungs.

1.1.2. Klassifikation der NET des Magens

1.1.2.1 Verschiedene histopathologische Klassifizierungsmöglichkeiten

Im Jahr 2000 erschien ein Klassifizierungssystem der WHO (**Tabelle 1**).

Tabelle 1: Klassifikation der Magen NET nach WHO 2010

Klassifikation der Magen NET nach WHO 2010

1a: Gut differenzierte NET (Synonym: Karzinoid)

- Benigne: bis zu 1cm Größe, sicher auf Mucosa und Submucosa beschränkt, kein Angioinvasion

-Unbekanntes Malignitätspotential:

bis zu 2cm Größe. Beschränkt auf Mucosa und Submucosa, mit oder ohne Angioinvasion

1b: Gut differenziertes NET (Synonym: malignes Karzinoid)

-Niedrig maligne: Über 2cm Größe, infiltriert Muscularis propria und darüber hinaus oder bereits Metastasiert

2: Schlecht differenzierter NET

- Hoch maligne

Hierbei werden die Neoplasien des Magens aus histomorphologischer Sicht in gut differenzierte neuroendokrine Tumoren, gut differenzierte neuroendokrine Karzinome und schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome unterteilt ¹. Der Begriff „Karzinoid“ kann hierbei als Synonym für die Begriffe gut differenzierter NET und gut differenziertes neuroendokrines Karzinom benutzt werden ².

Ein weiteres wichtiges histopathologisches Kriterium stellt die proliferative Aktivität dar, die anhand des Ki-67-Indexes gemessen wird. Die Einteilung erfolgt dabei in die drei Grade G1, G2 und G3. Der Ki-67-Index beschreibt den Anteil aktiver, also sich teilender Zellen, im Verhältnis zur untersuchten Gesamtzellpopulation. Die drei Grade werden in kleiner als 2%, 2-20% und über 20% eingeteilt.

Unter Zusammenschau der klinischen und histopathologischen Parameter können die gastralen neuroendokrinen Tumore (GNETs) anhand der TNM Klassifikation in klinische Stadien eingeteilt werden (**Tabelle 2**). Innerhalb der Gruppe der NET des Magens gibt es jedoch erhebliche Unterschiede untereinander, sodass diese ursprünglich in drei verschiedene Typen unterteilt und später um einen vierten ergänzt wurden ^{3,4}.

Tabelle 2: Die Einteilung nach der TNM-Klassifikation

| | | | |
|----------------------------------|--|---------|----|
| T – Primärtumor | | | |
| TX | Primärtumor kann nicht beurteilt werden | | |
| T0 | kein Anhalt für Primärtumor | | |
| Tis | Carcinoma in situ, schwere Dysplasie (< 0,5 cm) | | |
| T1 | Tumor infiltriert Lamina propria oder Submukosa und ≤ 1 cm | | |
| T2 | Tumor infiltriert Muscularis propria oder Subserosa oder > 1cm | | |
| T3 | Tumor infiltriert die Serosa | | |
| T4 | Tumor infiltriert andere Organe | | |
| N – regionäre Lymphknoten | | | |
| NX | regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden | | |
| N0 | keine regionalen Lymphknotenmetastasen | | |
| N1 | regionale Lymphknotenmetastasen | | |
| M – Fernmetastasen | | | |
| MX | Fernmetastasen können nicht beurteilt werden | | |
| M0 | keine Fernmetastasen | | |
| M1 | Fernmetastasen | | |
| Klinische Stadien | | | |
| Stadium 0 | Tis | N0 | M0 |
| Stadium I | T1 | N0 | M0 |
| Stadium IIa | T2 | N0 | M0 |
| | IIb | T3 | N0 |
| Stadium IIIa | T4 | N0 | M0 |
| | IIIb | jedes T | N1 |
| Stadium IV | jedes T | jedes N | M1 |

1.1.2.2. Gebräuchlichste Einteilung nach Typ 1-4

Die Einteilung in die vier biologisch relevanten Typen (**Tabelle 3**) erfolgte nach ihren jeweiligen gewebsspezifischen Merkmalen welche sich u.a. in ihrer jeweiligen Häufigkeitsverteilung, Differenzierung und Prognose unterscheiden ⁴.

Typ 1 Neoplasien stellen ca. 50-80% aller Magen-NETs dar und gehen in der Regel mit einer atrophen Gastritis einher. Sie treten überwiegend bei Frauen zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr auf, zeigen sich als nicht funktionell aktive Tumore und erscheinen typischerweise im Korpus und Fundus als weniger als 1 cm kleine multipolypöse Schleimhautvorwölbungen ⁵. Das Vorkommen einer die Mucosa überschreitenden Infiltration ist dabei sehr selten, woraus sich ein entsprechend geringes Metastasierungsrisiko von 2-5% ergibt ^{5, 6}. Verursacht durch die atrophe Gastritis kommt es zu einem vermehrten Untergang von HCl (Chlorwasserstoffsäure) produzierenden Parietalzellen. Als Konsequenz führt dies zu einer verminderten Acidität der Magensäure, wodurch rückgekoppelt vermehrt Gastrin produziert wird, welches seinerseits die ECL Zellen (ECL = enterochromaffine-like cell) zur Produktion von Histamin anregt. Histamin stimuliert hieraufhin die noch nicht zerstörten Parietalzellen zur vermehrten Herstellung von Magensäure. Es entsteht dadurch eine ECL-Hyperplasie, aus der sich das typische Bild einer Typ-1 Neoplasie entwickelt. Mikroskopisch stellen sich die Tumore gut differenziert dar und sind trabekulär bis solide aufgebaut. Die Proliferationsrate (Ki-67/MIB1-Index) liegt bei maximal 2%. ECL-Zellen zeigen sich stark Chromogranin-A-positiv und sind durch eine Exprimierung von VMAT2 (vesikulärer Monoamintransporter 2) sowie meist auch α -HCG charakterisiert ^{2, 4}.

Beim Typ-2 Magen-NET handelt es sich mit 5-6% aller Fälle um einen weniger häufig ausgeprägten Typ, von dem Männer und Frauen ungefähr gleich häufig betroffen sind. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 45 Jahren. Der Tumor ist ebenfalls trabekulär aufgebaut und tritt besonders häufig im Korpus oder Fundus auf. Er ist regelhaft mit einem MEN 1 (multiple endokrine Neoplasie Typ 1) assoziiertem Zöllinger-Ellison-Syndrom (ZES) bzw. Gastrinom vergesellschaftet, tritt jedoch fast nie bei einem sporadischen ZES ohne MEN 1 auf ⁴. Etwa 13-37% solcher MEN 1 assoziierten ZES-Fälle weisen einen NET Typ 2 auf ⁷. Ähnlich wie beim Typ 1 bewirkt der hohe Gastrinspiegel auch hier eine ECL-Hyperplasie. Der Tumor stellt sich in der Regel relativ klein mit 1-2cm und multipolypös dar. Der Proliferationsindex ist ebenfalls gering und liegt meist unter 2%. Er neigt jedoch vermehrt zur Metastasierung, wobei Lymphknotenmetastasen in bis zu 30% und Lebermetastasen in bis zu 10% der Fälle beschrieben wurden. Während beim Typ 1 praktisch keine krankheitsbezogenen Todesfälle berichtet werden, geht man beim Typ 2 in bis zu 10% von tumorassoziierten Todesfällen aus ^{5, 7}.

Der mit 14-25% zweithäufigste Typ 3 tritt hingegen sporadisch ohne bekannte Assoziation zu anderen Erkrankungen bei einem Durchschnittsalter von 50 Jahren auf. Er zeigt mikroskopisch ein trabekuläres Muster und ist proliferativ aktiver als Typ 1 und 2 mit einem Ki-67-Index von in der Regel mehr als 2%. Es werden ferner keine ECL-Hyperplasien oder andere Magenschleimhautveränderungen beobachtet. Für die polypoiden, solitär auftretenden Neoplasien gibt es keine bevorzugte Lokalisation im Magen. Zum Diagnosezeitpunkt weisen sie oft eine Größe von mehr als 1-2cm auf. Entscheidend für die Prognose ist das im Vergleich zu Typ 1 und 2 weitaus häufigere in die Muscularis propria einwachsende Tumorgewebe oder das Vorliegen einer Angioinvasion, sodass sich entsprechend häufiger Fernmetastasen finden lassen. Da sich in über 50% der Fälle bei diagnostiziertem Typ-3 GNET bereits Fernmetastasen in Lymphknoten und/oder der Leber zeigen, ist beim Fund eines Typs 3 die Suche nach Fernmetastasen generell indiziert. Dementsprechend hoch ist die tumorassoziierte Mortalität von 25-30% bei einer durchschnittlichen 5-Jahres-Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit von knapp unter 50% ^{2, 4, 5}.

Über den relativ seltenen Typ 4 NET des Magens wurde das erste mal 1974 von Matsusaka et al. berichtet ⁸. Seitdem wurden lediglich 110 Fälle in der Weltliteratur beschrieben ⁹. Es handelt sich hierbei um ein schlecht differenziertes Karzinom, das tendenziell im hohen Alter, insbesondere ab 60 Jahren auftritt. Im

Vergleich mit den Typen 1-3 ist die Typ 4 Neoplasie durch die schlechteste Prognose gekennzeichnet, da sie in der Regel erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. Der Typ 4 NET zeigt sich in seinem Wachstum ausgesprochen aggressiv, sodass durch Infiltration der Muskelschicht und Einbruch in das Gefäßsystem das Vorfinden zahlreicher Fernmetastasen bei Erstdiagnose eher die Regel als Ausnahme ist. Die jährliche Überlebensrate liegt bei lediglich 50%^{2, 4, 10}. Zum Diagnosezeitpunkt haben die Tumore nicht selten eine Größe von über 5 cm erreicht und sind bereits exulzeriert. Histomorphologisch zeigen sie Ähnlichkeiten mit klein- oder großzelligen Bronchialkarzinomen und weisen einen hohen Proliferationsindex von meist 20-30% auf.

Tabelle 3: Allgemeine Charakteristika NETs des Magens

| | Typ 1 | Typ 2 | Typ 3 | Typ 4 |
|---------------------------------|--|--|----------------------------|---------------------------------------|
| Anteil an GNETs | 70-80% | 5-6% | 14-25% | 6-8% |
| Eigenschaften | oft klein (< 1–2 cm) meist multipel | oft klein (< 1–2 cm) meist multipel | solitär oft > 2 cm | solitär oft exulzeriert, > 2 cm |
| Assoziation | CAG | MEN1/ZES | keine | keine |
| Histologie | gut differenziert G1 | gut differenziert G1 | gut differenziert G1/G2 | schlecht differenziert G3 |
| Serum Gastrin | sehr hoch | sehr hoch | normal | normal |
| Magensaft-pH | anazid | hyperazid | normal | normal |
| Metastasen | < 10% | 10–30% | 50–100% | 80–100% |
| Tumorbedingte Todesfälle | < 1% | < 10% | 25–30% | > 50% |
| KI-67 | meist <2% | meist < 2% | 2-20% | > 20% |

1.1.3 Epidemiologie und Risikofaktoren der NET des Magens

Allgemein betrachtet handelt es sich bei NETs obgleich ihres Ursprungs bzw. Lokalisation um eine sehr seltene Erkrankung. Die jährliche Inzidenz liegt bei 2,5 bis 5 Fällen pro 100 000 Einwohnern basierend auf US-Amerikanischen und schwedischen Daten^{11, 12}. Die Mehrzahl der neuroendokrinen Tumore hat einen gastrointestinalen oder bronchopulmunalen Ursprung. Dabei machen die neuroendokrinen Tumore lediglich 0,49% aller malignen Neuerscheinungen aus. Von allen neu aufgetretenen NET entfallen wiederum nur 4,1-4,8% auf neuroendokrine Tumore des Magens^{11, 12}. Auf Deutschland extrapoliert kann davon ausgegangen werden, dass ca. rund 100-200 Menschen jedes Jahr neu an einem gastralen NET erkranken. Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass die tatsächliche jährliche Inzidenz an NETs deutlich höher liegt. So hat eine groß angelegte Autopsie-Studie in Schweden gezeigt, dass in bis zu 8,2 von 100 000 Einwohnern NETs jeglichen Ursprungs zu finden sind¹³. Eine umfangreiche Metaanalyse von Modlin et al. zeigte eine steigende Tendenz des Anteils an GNETs innerhalb aller gastraler Malignitäten von 0,3% auf 1,77% innerhalb der letzten 50 Jahre. Der Anteil von GNETs innerhalb aller gastro-entero-pankrealer NET (GEP-NET) war dabei von 2,4% auf 8,7% angestiegen. Das Verhältnis zwischen den Geschlechtern stieg von 1 zu 1,1 zwischen Männern und Frauen auf 1 zu 1,8 zu Ungunsten der Frauen, wonach diese fast doppelt so häufig an GNETs erkranken wie Männer¹⁴. Diese Zahlen lassen sich vor allem dadurch erklären, dass der häufigste Typ der GNETs, der Typ1, ein häufigeres Auftreten bei Frauen im Vergleich zu Männern zeigt. Es ist nicht bekannt, woraus das verstärkte Auftreten von neuroendokrinen Magentumoren resultiert. Die gängigste Meinung derzeit ist, dass bedingt durch die Fortschritte in der Medizintechnik mit verbesserten Diagnostikmöglichkeiten wie Ultraschall, Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT)

etc., und einer gehäuften Anzahl an Gastroskopien, mehr Befunde zufällig entdeckt werden als je zuvor¹². Die Überlegung, eine steigende Anzahl an Inzidenzen könne mit der gestiegenen Verabreichung von Protonenpumpenhemmern (PPI) zu tun haben, wurde in einigen Studien ebenfalls untersucht. In Tierversuchen deutete sich ein möglicher Zusammenhang zwischen Säureblockade bei hohen PPI-Gaben und dadurch gestiegenen Gastrinwerten mit folglich resultierender ECL-Zell-Hyperplasie an¹⁵. In Metaanalysen konnte jedoch ein statistischer Zusammenhang zwischen PPI-Einnahme und Auftreten von GNETs nicht nachgewiesen werden^{16,17}.

Ein gesicherter Risikofaktor ist neben dem Geschlecht auch die Ethnie. So konnte in US-Amerikanischen Studien gezeigt werden, dass in der nicht-weißen im Vergleich zur weißen Bevölkerung die Inzidenz für GNETs achtmal höher ist. Ein weiterer relevanter Faktor ist das Alter. So treten alle Arten von NETs bei Patienten unter 60 Jahren häufiger auf als bei Patienten, die über 60 Jahre alt sind. Rauchen zeigte sich unabhängig von Dauer des Nikotinkonsums und Anzahl an Zigaretten pro Tag hingegen nicht als Risikofaktor. Ebenfalls konnte kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von GNETs und Alkoholkonsum gezeigt werden. Patienten mit Diabetes mellitus (DM) Typ II hingegen haben ein erhöhtes Risiko an GNETs zu erkranken. Die Erkrankungsdauer spielt hierbei eine ausgeprägte Rolle: So zeigte sich, dass Patienten mit einer Erkrankungsdauer von über einem Jahr ein 5,6-mal höheres Risiko für einen GNET hatten als solche, bei denen der DM weniger als 1 Jahr bekannt war. Insulinpflichtige männliche bzw. weibliche Patienten hatten ein nochmals um den Faktor 1,3 bzw. 4,9 höheres Risiko einen GNET zu entwickeln. Vor allem Frauen mit DM und einer Erkrankungsdauer von über 1 Jahr haben ein 8-mal höheres Risiko für einen GNET als Frauen ohne Diabetes¹⁸.

Eine positive Familienanamnese zeigt bei männlichen Patienten keinen relevanten Einfluss auf die Inzidenz, während Frauen hingegen ein 5-fach erhöhtes Risiko haben. Für Frauen erhöht sich das Risiko beim Vorliegen eines DM bei gleichzeitig positiver Familienanamnese sogar 52-fach im Vergleich zu Patientinnen ohne DM und gleichzeitig negativer Familienanamnese¹⁸. Die exakte Kausalität des Zusammenhangs zwischen DM und GNETs ist nicht bekannt. Ein möglicher Ansatz ist eine durch den Langzeitdiabetes ausgelöste chronische Inflammation, die das Auftreten einer chronisch-atrophen Gastritis begünstigt, mit folglich gesteigertem oxidativen Stress innerhalb der Zellen. Stressbedingt können dabei DNA-Mutationen provoziert werden, die Ursache für die Entwicklung von GNETs sein können¹⁹.

1.1.4. Klinik, Diagnostik und Therapie

1.1.4.1. Klinische Präsentation und Symptomatik

Klinisch machen sich NET des Magens zunächst kaum bemerkbar. Wenn Symptome auftreten, dann handelt es sich meist um unspezifische Oberbauchbeschwerden, gastrointestinale Hämorrhagien, Diarrhö und ungewollte Gewichtsabnahme. In der Regel werden GNETs als Zufallsbefunde im Rahmen von Routine-Endoskopien diagnostiziert^{2, 11, 14, 20}. Gleichzeitig zeigte sich hierbei ein erhöhtes Auftreten einer perniziösen Anämie bei bis zu 29% der Betroffenen²¹. Diese Patienten hatten eine Typ 1 Läsion, welche generell mit einer atrophen Gastritis vergesellschaftet ist. Durch die progrediente Atrophie der Magenschleimhaut kommt es zu einer Verminderung der Parietalzellen mit entsprechend geringerer Produktion des für die Aufnahme von Vitamin B12 benötigten Intrinsic factors.

Es wurden einige Typ 3 NETs beschrieben, die sich klinisch mit massiven Hämorrhagien präsentierten^{22, 23}. Ursächlich dafür waren vaskuläre Abnormitäten als Resultat lokal wirksamer Angiogenese-fördernder Wachstumsfaktoren²⁴.

Flush-Anfälle mit Diarrhöe, wie sie bei Karzinoiden des Dünndarms typischerweise auftreten, werden nur in Ausnahmefällen bei GNETs beobachtet²⁵⁻²⁷. Hierbei kann es jedoch zu Besonderheiten kommen. Während

beim Karzinoidsyndrom des Dünndarms Serotonin (5-hydroxytryptamin) für die Symptomatik verantwortlich ist, kann es sich beim Karzinoidsyndrom, welches von den ECL-Zellen ausgeht, um 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) handeln. Aufgrund der fehlenden Dopa-Decarboxylase, welche v.a. im Darm und Nieren vorkommt, kann im Magen 5-HTP nicht ausreichend in Serotonin umgewandelt werden. Bei dieser Form des Karzinoidsyndroms kommt es zu einem intensiveren und verlängerten rotvioletten Flushing, das oft die Gliedmaßen und den oberen Stamm betrifft, sowie mit Teleangiektasien einhergeht²⁸.

1.1.4.2 Diagnostik von NETs

Das diagnostisch wichtigste Instrument bleibt die Probenentnahme während der Endoskopie, sowie die anschließende histomorphologische Aufarbeitung. Dabei stellen sich die Tumore aufgrund von Cholesteroll- und Lipidansammlungen als gelbliche Exophyten mit gelegentlich zentralen Ulzerationen dar. Zur korrekten Charakterisierung der Läsion bedarf es einer erweiterten Probeentnahme. So müssen neben der Biopsie bzw. der Abtragung der größten Polypen mindestens zwei Proben aus dem Antrum und vier Proben aus dem Corpus entnommen werden. Dieses Verfahren dient insbesondere zur sicheren Unterscheidung zwischen einem Typ 1 und Typ 3 NETs. Findet sich bei der histologischen Untersuchung in den Proben aus dem erweiterten Bereich eine chronisch-atrophe Gastritis und eine ECL-Hyperplasie, so kann man in aller Regel von einem Typ 1 ausgehen, der im Vergleich zu Typ 3 eine wesentlich bessere Prognose aufweist². Die Einschätzung der Proliferationsrate und das Ausmaß an Dysplasien kann mit herkömmlichen histologischen Methoden erschwert beurteilbar sein. Die histochemische Analyse mit Chromogranin A und Synaptophysin ist hierbei besonders bedeutend, um Hyperplasien und maligne Transformationen von ECL-Zellen aufzuspüren^{7, 27, 29, 30}. Eine Bestimmung des Ki-67-Indexes sollte in jedem Fall erhoben werden.

Als nächster diagnostischer Schritt schließt sich regelhaft die Endosonographie an. Diese ist vor Allem bei Tumoren mit einer Größe von 1 cm prognostisch wegweisend⁵. Hierbei können in 90% die Infiltrationstiefe des Tumors bestimmt werden und in 75% der Fälle, sofern vorhanden, perigastrisch befallene Lymphknoten auffindig gemacht werden^{31, 32}. Bei Tumoren mit einer Größe von <1cm ist die Endoskopie mit Probeentnahme zur histomorphologischen Aufarbeitung die einzig empfohlene Untersuchung. Bei Neoplasien mit Verdacht auf eine Infiltration, bei starker Entdifferenzierung oder Typ 3 bzw. Typ 4 NETs sollte eine erweiterte Suche zur Detektion von Fernmetastasen vorgenommen werden. Transabdominaler Ultraschall, CT und MRT sind diesbezüglich durch eine hohe Sensitivität und Spezifität gekennzeichnet. Die Somatostatin-Rezeptor-Szintigraphie (SRS) wird bei Patienten mit gut-differenzierten Tumoren empfohlen, um Knochen-, Leber- und Lymphknotenmetastasen zu detektieren⁵. Bei Patienten mit Typ 1 oder 2 GNETs kann als weiterer diagnostischer Marker das Serum-Gastrin bestimmt werden. Dieser ist in der Regel erhöht³³⁻³⁵. Da viele dieser Patienten jedoch an einer Gastritis leiden und über lange Zeit PPIs eingenommen haben, kann dieser Wert durch die PPI-Einnahme verfälscht erhöht sein. Daher sollte nicht nur Gastrin allein, sondern auch Serum Chromogranin A bestimmt werden³⁶. Bei beiden Hormonen muss jedoch festgehalten werden, dass sie sich aufgrund ihrer geringen Spezifität weniger zur Tumorsuche als viel mehr zur Verlaufskontrolle eignen. Während beim Typ 1 der Gastritis eine nicht-peptische Ursache zugrunde liegt, der Magensaft pH sogar nicht selten erhöht sein kann, handelt es sich beim Typ 2 um eine Gastritis, die durch eine Übersäuerung des Magensaftes gekennzeichnet ist. Um beide Formen zu unterscheiden, kann eine pH-Metrie durchgeführt werden und eine Suche auf ein Autoimmungeschehen mittels Anti-Parietalzell- und Anti-Intrinsic-Factor-Antikörpern stattfinden, die in ca. 50% aller Patienten mit chronisch-atropen Gastritis nachweisbar sind³⁷.

1.1.4.3 Therapie- und Präventionsstrategien

Vorsorgeuntersuchungen zur frühzeitigen Detektion von Magenkarzinomen wurden in Japan etabliert³⁸. So wird von dort ein Anteil von 5,1% an fortgeschrittenen Tumorstadien neuroendokriner Karzinome bei Diagnosestellung gemeldet³⁹. Durch die zunehmende Anzahl an Gastroskopien konnte auch in den USA die Rate fortgeschrittener Tumorstadien von einst 23,8% in den 50er und 60er Jahren auf 6-8% in den 90er Jahren gesenkt werden^{11, 14, 40}. Die 5-Jahres-Überlebensrate hat sich aktuell auf 71% verbessert und lag noch in den 70er Jahren bei etwas über 50%^{11, 40}. Hieraus ergeben sich die Empfehlungen, dass jüngere Patienten mit einer autoimmunen chronisch-atrophen Gastritis alle 2-3 Jahre endoskopisch verlaufskontrolliert werden sollten. Eine engmaschige endoskopische Kontrolle sollte auch für Patienten mit einem MEN1 assoziiertem ZES stattfinden, da sich bei fast jedem vierten Patienten ein Typ 2 GNET entwickeln^{41, 42}.

Die Therapie- und Nachsorgeempfehlungen sind nicht einheitlich und befinden sich noch in der Entwicklung, da aufgrund der geringen Prävalenz der Erkrankung umfangreiche Metaanalysen fehlen⁴³. Grundsätzlich richtet sich die Empfehlung dabei nach der Anzahl an detektierten Polypen, dem Stadium und der Größe des Tumors, der Infiltrationstiefe, dem Nachweis einer Angioinvasion, sowie dem histologischen Differenzierungsgrad. Bei Vorliegen von bis zu 5 Polypen eines gut differenzierten Tumors des Typ 1 und 2, die kleiner als 1 cm und sicher auf Mukosa bzw. Submukosa beschränkt sind, keine Angioinvasion aufzeigen und keine Metastasen vorweisen, sollten in 12-monatigen Abständen endoskopische Nachsorgeuntersuchungen erfolgen^{2, 44}. In der Literatur finden sich jedoch auch aggressivere Herangehensweisen, bei denen die Entfernung aller sichtbaren Läsionen mittels Zangenbiopsie und endoskopischer Mukosaresektion vorgeschlagen werden^{45, 46}. GNETs des Typ 1 haben bis zu einer Größe von 1 cm ein sehr geringes Risiko für Metastasen. Wird diese Grenze jedoch überschritten, sollte eine komplette Resektion des Tumors erfolgen^{14, 20}. Bei Invasion tieferer Schichten und tumor-positiven Schnittträgern nach endoskopischer Mukosaresektion wird eine chirurgische Resektion empfohlen⁴⁴. Charakteristisch für den Typ 1 ist ein multi-polypöses und auch nach Abtragung wiederkehrendes Erscheinungsbild. Eine Möglichkeit, dem entgegenzuwirken und die chronische ECL-Zell-Stimulation durch zu hohe Gastrinspiegel zu unterbrechen, ist die chirurgische Antrumsresektion. Diese zeigt sich in ca. 80% als effektive Therapiestrategie⁴⁴. In einigen Fällen kann der Tumor jedoch bereits autonom geworden und damit gastrinunabhängig sein. Ein Octreotid-Suppressions-Test soll daher im Vorfeld klären, ob eine Antrumsresektion einen Vorteil erbringt. Hierbei wird die Gastrinabhängigkeit durch Messung der Histidin-Decarboxylase-mRNA (HDC-mRNA) in Probebiopsien vor und nach Octreotidgabe untersucht⁴⁷. HDC ist das Enzym, welches aus Histidin in den ECL-Zellen Histamin generiert. Dieser Prozess ist gastrinabhängig. Ein Abfall in der HDC-mRNA weist auf eine weiterhin bestehende Gastrinabhängigkeit eines Tumors hin⁴⁴. Auch wenn die Tumorgöße maßgeblich für die Behandlungsstrategie ist, so gibt es weitere Hinweise darauf, dass es bei Tumoren mit einer Größe <1 cm weitere prognostische Faktoren zu berücksichtigen gibt. So ist ein hoher Proliferationsindex Ki-67 und der Beweis eines invasiven Wachstums als Indikation für eine therapeutische Behandlung zu sehen, die über die reine regelmäßige endoskopische Nachkontrolle hinausgeht. Derzeit kann die histologische Analyse allein jedoch keine ausreichende Prädiktion über das Auftreten von Metastasen liefern⁴⁴.

Somatostatin hemmt die Gastrinsekretion aus den G-Zellen des Antrums. So werden Somatostatin-Analoga (SSA) z.T. in der Behandlung von GNETs des Typ 1 und 2 benutzt. Ihr Einsatz findet allerdings nur limitiert statt⁴³. Außer bei funktionalen Tumoren, also solchen, die ihrerseits hormonaktiv sind oder durch andere gastrinproduzierende Tumore (z.B. pankreatische Gastrinome) unterhalten werden, gibt es keine Empfehlung zur Primärtherapie mit Verabreichung von SSAs⁴⁴. Ziel ist hierbei v.a. die Linderung der tumorassoziierten hormonbedingten Symptome. Studien haben jedoch gezeigt, dass eine Therapie mit SSAs, auch bei den gewöhnlichen Typ 1 Tumoren über sechs Monate appliziert zu einer Verkleinerung der

Größe und Anzahl der Tumoren geführt hat, verbunden mit einem Abfall der Chromogranin A- und Gastrinspiegel²⁴. Studien zum Vergleich der SSA-Therapie zur operativen Resektion liegen aktuell jedoch noch nicht vor⁴³.

Die Behandlung des Typ 2 neuroendokrinen Magenkarzinoms ist ungleich komplexer und bedarf einer individuellen Lösung in spezialisierten NET-Zentren. Hierbei steht v.a. die häufig vorhandene Vergesellschaftung mit dem ZES/MEN-1 Syndrom bzw. das Vorhandensein eines Gastrinoms im Vordergrund. Eine endoskopische Behandlung kann gegebenenfalls eine Option sein. Eine Exzision sollte nur in ausgewählten Fällen stattfinden und insbesondere dann erfolgen, wenn sich in der Histologie ein schlecht differenzierter Tumor zeigt. Es gibt jedoch aktuell keine Studien, die eine eindeutige Mortalitätsverringerung durch die endoskopische Resektion zeigen, insbesondere bei solchen Patienten, die ein medikamentös kontrollierbares ZES/MEN1- Syndrom haben^{43, 44}. In diesen Fällen hat sich hinsichtlich der Reduktion des Tumorwachstums eine Behandlung mit dem SSA Octreotid erfolgreich gezeigt⁴⁸.

Bei Karzinomen des Typs 3 bestehen relativ eindeutige Therapieempfehlungen. Diese sind weitestgehend gleichzusetzen mit denen in der Behandlung der Adenokarzinome des Magens. Hierzu gehört die Teilresektion oder auch komplette Resektion des Magens mit ausgeweiteter Lymphknotenresektion, wobei für kleinere Läsionen auch endoskopische Abtragungen in Erwägung zu ziehen sind^{20, 49}.

Eine fortgeschrittene Erkrankung zeichnet sich v. a. durch eine Filialisierung der Leber aus. Obwohl man hier generell von einer palliativen Situation ausgehen muss, macht die Behandlung der Lebermetastasen zur Reduktion der Tumorlast durchaus Sinn. Hierbei kommen die hepatische Resektion, Embolisation von Seitenästen der A. hepatica, sowie die Radiofrequenzablation und Kryoablation in Frage^{50, 51}.

Zytotoxische Chemotherapie spielt nur eine geringe Rolle in der Behandlung von Magen NETs. Es hat sich gezeigt, dass eine Behandlung von Patienten mit Metastasen mit den Chemotherapeutika 5-Fluorouracil, Streptozotocin oder Doxorubicin keinen Vorteil bringt⁵²⁻⁵⁴. Eine Kombination mehrerer dieser Wirkstoffe hat ebenfalls keinen signifikanten Vorteil erbracht, sondern ist im Gegenteil aufgrund der hohen Toxizität eher als prognostisch ungünstig einzustufen⁵²⁻⁵⁵.

Besonders der Typ 3 der GNETs zeigt sich generell stark vaskularisiert. Dem liegt eine starke Expression des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) zugrunde. Behandlungsversuche mit Angiogenesehemmenden Mitteln wie Bevacizumab geben jedoch Hinweise darauf, dass hierdurch das Tumorwachstum entscheidend verlangsamt werden kann^{56, 57}.

Die Inhibierung des mammalian Target Of Rapamycin (mTOR)-Pfades, der mit dem VEGF-Signalweg in engem Zusammenhang steht, stellt ebenfalls einen neueren Angriffspunkt in der Therapie dar^{58, 59}. Einige aktuelle Arbeiten haben gezeigt, dass in klinischer Anwendung eine pharmakologische Inhibierung des mTOR-Signalwegs, beispielsweise mittels Everolimus, prognostisch vielversprechende Resultate hervorbringt^{60, 61}.

Schlecht differenzierte Karzinome bzw. solche des Typs 4 sollten wie kleinzellige Bronchialkarzinome wenn möglich im Gesunden reseziert werden. Dies kann gegebenenfalls mit einer Gastrektomie oder entsprechend chemotherapeutischer Nachbehandlung verbunden sein^{51, 62, 63}. Eine lokale endoskopische Resektion wird in diesem Fall nicht empfohlen.

Ein relativ neuer Ansatz zur Behandlung von NETs ist die sog. Peptidrezeptor-Radionuklidtherapie (PRRT). Diese Therapieform basiert auf der verstärkten Ausprägung von Somatostatin-Rezeptoren auf NETs. An diese Rezeptoren kann synthetisch hergestelltes Somatostatin binden, wie z.B. Octreotid. An Octreotid wiederum können bestimmte Radionukleotide gebunden werden. Dieses Prinzip macht man sich bei der Bildgebung im PET-CT zur Detektion von etwaigen NETs und deren Fernmetastasen zunutze. Durch den Austausch der diagnostischen gegen therapeutische Radionukleotide nutzt man deren Strahleneigenschaften zur lokalen Radio-Therapie⁶⁴. Das Einsatzgebiet beschränkt sich jedoch nur auf inoperable bzw. nicht resektable Tumore die in der Regel metastasieren sind und langsam wachsen. Da

jedoch nur ca. ¼ aller NETs eine verstärkte Somatostatin-Rezeptor Expression aufweisen, stellt diese Therapieform nicht für alle Patienten eine Möglichkeit dar. Auch gibt es aufgrund der geringen für diese Therapiestrategie in Frage kommenden Fälle nur vergleichsweise wenige Zentren deutschlandweit, die diese durchaus kostenintensive Behandlung anbieten.

1.2. Der mTOR-Pfad

1.2.1. Allgemeine Grundlagen und Aufbau des mTOR-Pathways

Das Enzym 'mTOR', mammalian Target Of Rapamycin, bedeutet übersetzt das Ziel für Rapamycin in Säugetieren. Aufgrund des Vorkommens in fast allen Tieren und nicht nur in Säugetieren wird es alternativ auch als 'mechanistic Target of Rapamycin' bezeichnet.

mTOR ist ein Protein mit enzymatischer Aktivität, welches in seiner Funktion als Serin-Threonin-Kinase fungiert und Proteine und Enzyme phosphoryliert und damit aktiviert. Dabei ist mTOR an einer Vielzahl an vital essentiellen Vorgängen in der Zelle beteiligt und trägt zu deren Regulation in Bezug auf Wachstum, Überleben, Vermehrung, Proteinsynthese und Tod bei⁶⁵. Rapamycin ist ein Makrolid, das ursprünglich aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde. Es bindet an mTOR und inhibiert damit seine proliferative Funktion, was zu zahlreichen insgesamt antiproliferativen Effekten führt, die aufgrund dessen auch in der Transplantationsmedizin genutzt werden.

mTOR ist Teil zweier unterschiedlicher Proteinkomplexe: mTOR Complex 1 (mTORC1) und mTOR Complex 2 (mTORC2). Dabei besteht mTORC1 aus folgenden Proteinen bzw. Enzymen: mTOR, regulatory-associated protein of mTOR (Raptor), mammalian lethal with SEC13 protein 8 (MLST8), Dishevelled Egl-10 and Pleckstrin domain-containing mTOR-interacting protein (DEPTOR) und Prolin-rich Akt substrate of 40kDa (PRAS40). Dieser Komplex kontrolliert die Proteinsynthese in Abhängigkeit von Nährstoff- und Energieangebot. So stimulieren Insulin, Wachstumsfaktoren, Aminosäuren und ein hohes Sauerstoffangebot die Aktivität von mTORC1⁶⁶⁻⁶⁸. Der aktivierte mTORC1 interagiert dabei mit Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) und Ribosomal protein S6 kinase beta-1 (S6K1).

mTORC2 besteht aus mTOR, rapamycin-insensitive companion of mTOR (RICTOR), MLST8, G protein β subunit-like protein (G β L), Protor 1/2, DEPTOR, TELO2-interacting protein 1 homolog (TTI1), telomere maintenance 2 (TEL2) und dem mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1 (mSIN1)^{69, 70}. Der Komplex spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Zytoskeletts und des zellulären Metabolismus.

mTORC1 und mTORC2 sind Bestandteil eines Multikomplex-Systems, welches zahlreichen Regulatoren und enzymatisch aktiven weiteren Proteinkomplexen unterworfen ist. Die zentralen Elemente dieses Systems sind neben den mTOR-Komplexen das TSC1/TSC2 Tetradimer, der Rag-Komplex, der Akt/PKB-Signalweg, das Phosphataseprotein Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN) und die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K).

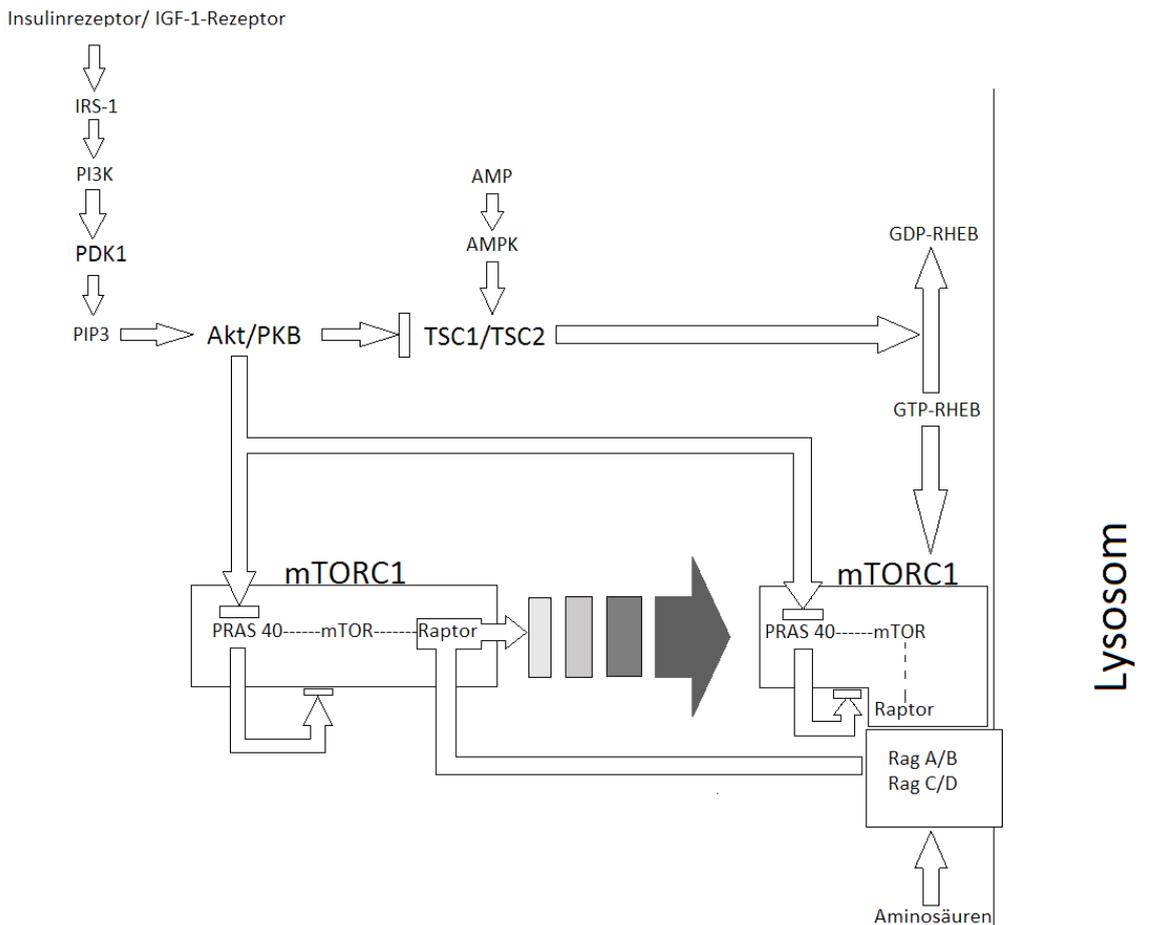
1.2.2. Steuerung und Signalwege des mTOR-Pfads

Die Signalwege des mTOR-Pfades können grob in zwei Richtungen eingeteilt werden, in eine sogenannte 'Upstream'- und eine 'Downstream'- Komponente. Als Upstream werden jene Bestandteile bezeichnet, die den mTOR-Pfad aktivieren oder hemmen. Als Downstream werden solche definiert, die in der Synthese von Proteinen resultieren⁷¹. Die Upstream- Effektoren können in verschiedene Kategorien eingeteilt werden, die über ihren jeweiligen Signalweg die Aktivierung von mTOR erhöhen oder verringern können

(Abbildung 1). Dazu zählen v.a., jedoch nicht ausschließlich, das Energie-, Insulin- und Aminosäureangebot
66-68, 72-74

Eine Ausschüttung von Insulin bzw. dem Insulin-like-Growth Factor (IGF-1) aktiviert Insulinrezeptoren (IR) und IGF-1-Rezeptoren (IGF-1R). Die Rezeptoren ihrerseits phosphorylieren das Signalprotein Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1). Das nun phosphorylierte IRS-1 eröffnet Bindungsstellen für PI3K. IRS-1 und PI3K zusammen vermitteln über die Aktivierung von Phosphoinositide-Dependent Kinase-1 (PDK1) die Bildung von Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP3) [80]. PIP3 seinerseits aktiviert den Akt/PKB-Signalweg. Dieser führt einerseits zur Phosphorylierung von bestimmten Komponenten des TSC1/TSC2 Komplexes als auch von PRAS40. Bei der Phosphorylierung von TSC1/TSC2 an den Serinresten 939 und 981, sowie am Threoninrest 1462 kommt es zur Dissoziation von TSC1 und TSC2. Dies hat zur Folge, dass TSC2 seine GTPase-Activating-Protein (GAP)-Funktion verliert. Funktionelles GAP interagiert mit dem an RAS Homolog Enriched in Brain (RHEB) gebundenen GTP, indem es GTP hydrolysiert und so aus dem aktiven GTP-RHEB-Komplex den inaktiven GDP-RHEB-Komplex bildet. Bei Dissoziation von TSC2 und damit dem Funktionsverlust von GAP bleibt der aktive GTP-RHEB-Komplex erhalten. Dieser Komplex ist für die Aktivierung von mTORC1 verantwortlich⁷³. Werden andere Stellen phosphoryliert, so kann dies hingegen zu einer höheren GAP-Aktivität führen und damit zu einer stärkeren mTORC1 Inhibierung. Vereinfacht ausgedrückt: Akt/PKB inhibiert den inhibitorisch wirkenden TSC1/TSC2-Komplex und aktiviert damit mTORC1. Das von Akt/PKB ebenfalls phosphorylierte PRAS40 wird hierdurch inaktiviert. Auch PRAS40 besitzt eine inhibitorische Funktion. Seine Inaktivierung ermöglicht die Interaktion von S6K1 und 4E-BP1 mit mTORC1 und resultiert letztendlich in einer Proteinbiosynthese⁷⁵. 4E-BP1 und S6K1 gehören selbst zum Downstream und sind im Folgenden näher erläutert.

Abbildung 1: Schematische Darstellung des mTOR-Signalweges in Verbindung mit mTORC1



Die Energieversorgung in der Zelle korreliert mit dem ATP-zu-AMP-Verhältnis. Steigt AMP im Verhältnis zu ATP über einen bestimmten Wert hinausgehend an, dann aktiviert dieses die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK). AMPK phosphoryliert TSC2 am Serinrest 1387, resultierend in einer Aktivierung von GAP und damit zu einer Inaktivierung des GTP-RHEB-Komplexes und mTORC1^{73, 76}.

Ohne eine ausreichende Menge an Aminosäuren, selbst bei genügender Energieversorgung der Zelle, findet keine mTOR vermittelte Proteinbiosynthese statt. Der Aminosäurepegel wird von einer Gruppe von GTPasen, den Rags, gemessen⁷². Dabei lagern sich vier unterschiedliche Rags zu einem Komplex zusammen, der an den Lysosomen und späten Endosomen lokalisiert ist. Bei ausreichender Menge an Aminosäuren in der Zelle ändern die Rags ihre Konformation und werden aktiviert. Sie interagieren mit Raptor und veranlassen dadurch die Bewegung von mTORC1 auf die Oberfläche der Lysosomen und späten Endosomen. An dieser Stelle ist auch der RHEB-GTP-Komplex lokalisiert, sodass am Ende der Insulin- und Aminosäuresignalweg zusammenlaufen⁷². Ohne Wachstumsfaktoren und Energie bleibt demnach der RHEB-GTP-Komplex nicht bestehen und ohne Aminosäuren findet keine Bewegung des mTORC1 zum RHEB-GTP-Komplex statt, um an diesem aktiviert zu werden. So stellt die Zelle sicher, dass nur bei ausreichendem Vorhandensein von Substraten eine Proteinbiosynthese stattfinden kann.

Stehen genug Nährstoffe und Energie zur Verfügung, findet der Downstream statt. Dabei interagiert mTORC1 direkt mit den Proteinen 4E-BP1 und S6K1. 4E-BP1 wird durch Phosphorylierung gehemmt, S6K hingegen aktiviert. 4E-BP1 seinerseits übt ebenfalls eine hemmende Funktion aus. Bei seiner Inaktivierung wird der eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) freigesetzt. Dieser setzt daraufhin eine Kaskade von Reaktionen in Gang, die letztendlich zu einer Initiierung des Translationskomplexes führt. Vermittelt wird dies durch die ribosomale Untereinheit 40S, welche im Rahmen der von eIF4E ausgelösten Reaktionskaskade das Start-Codon detektiert und bindet⁶⁵. S6K1 phosphoryliert seinerseits bei Aktivierung unter anderem das Ribosomale protein S6 (rpS6). RpS6 ist Teil der ribosomalen Untereinheit 40S. Hierdurch wird 40S aktiviert und kann die Translation durchführen⁶⁵. Vereinfacht kann also gesagt werden, dass die Inaktivierung von 4E-BP1 dazu führt, dass das Ribosom die mRNA binden kann und die Aktivierung von S6K1 die Aktivierungsenergie für das Ribosom bereitstellt.

1.2.3. Bedeutung des mTOR-Pfades

Die als Folge des Downstreams aktivierten und synthetisierten Proteine sind zahlreich und aktueller Gegenstand der Forschung. Einige davon konnten bereits ausreichend gut analysiert werden, sodass mittlerweile bekannt ist, dass der mTOR-Pfad eine wichtige Rolle im Zellzyklus, in der Angiogenese, im Muskelwachstum, in der Apoptose, im Immunsystem, in der Pathogenese einiger Krankheiten, im Altern und v.a. im Tumorwachstum spielt.

1.2.3.1 Die Bedeutung für den Zellzyklus

Der Zellzyklus wird von vielen Faktoren reguliert. Ob die Mitose einer Zelle in Gang gesetzt wird, hängt von mehreren Komponenten ab und wird an multiplen Stellen beeinflusst. Die Zelle durchläuft im Rahmen der Mitose die Phasen G0, G1, S und G2, die zusammengefasst als Interphase bezeichnet werden. In der G1-Phase finden zwei entscheidende Kontrollen statt. Zunächst wird geprüft, ob das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren gegeben ist, anschließend, ob genug Nährstoffe und Energie für die nachfolgenden Phasen bereitstehen⁷⁷. Die erste Kontrolle findet ungefähr in der Mitte der G1-Phase statt und wurde bereits im Jahr 1974 von Pardee et al. beschrieben⁷⁸. Diesen von Wachstumsfaktoren abhängigen Punkt bezeichnet man als restriction point (R). Ein weiterer Punkt, gegen Ende der G1-Phase gelegen, wurde von

Foster et. al 2011 als ‘‘cell growth’’ checkpoint’ beschrieben ⁷⁷. Dieser Kontrollpunkt ist mTOR-abhängig und damit indirekt abhängig vom Energie- und Aminosaureangebot. ‘‘Besteht’’ eine Zelle beide Kontrollen, so geht sie in die S-Phase ein, die keiner weiteren Regulation unterliegt. Somit verpflichtet sich die Zelle beim Übertritt in die S-Phase zunächst einmal zum Wachstum, im Sinne eines ‘‘Alles-oder-Nichts’’-Prinzips ⁷⁹. Das finale Signal für den Übergang von einer in die nächste Phase wird von bestimmten Proteinen, den sogenannten Cyclinen, gegeben. Der erste Kontrollpunkt R vermittelt über eine mit der Ras-GTPase startenden Signalkaskade zunächst einen Anstieg von Cyclin D, der zweite Kontrollpunkt ‘‘cell growth’’ checkpoint führt anschließend zu einem Anstieg von Cyclin E. Das Ansteigen der intrazellulären Konzentration von Cyclin D und schließlich Cyclin E führt dazu, dass die S-Phase eingeleitet werden kann ⁷⁷. So ist es letztendlich mTOR, der, über mehrere nachgeschaltete Signalwege, die aktuell noch nicht komplett bekannt sind, zu einer vermehrten Cyclin E –Synthese führt und damit die Zelle zum Wachstum anregt.

1.2.3.2. Die Bedeutung für die Angiogenese und Zellwachstum

Die Angiogenese ist von großer Bedeutung in der Entwicklung und im Wachstum von Tumoren. Schnell wachsende Karzinome brauchen eine gute Nährstoffversorgung, die sie durch neu und schnell einwachsende Gefäße gewährleisten. Zentraler Faktor der Angiogenese ist VEGF. Die Bildung von VEGF wiederum wird von einem bestimmten Transkriptionsfaktor initiiert, dem Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) ⁸⁰. HIF-1 besteht aus je einer alpha- und einer beta-Untereinheit die nur in gegenseitiger Verbindung ihre Wirkung entfalten. Beide Untereinheiten werden kontinuierlich exprimiert, jedoch hängt die Konzentration von HIF-1-alpha vom Sauerstoffgehalt in der Zelle ab. Bei normaler Sauerstoffversorgung wird HIF-1-alphaverstarkt abgebaut, bei Hypoxie durch weniger Hydroxylierungen weniger stark abgebaut. Es hat sich gezeigt, dass mTOR in diesem Signalweg eine relevante Rolle spielt ^{80, 81}. mTOR ist zwar nicht obligat notwendig für die Bildung von HIF-1, aber entscheidend für seine maximale Expression. Wie genau mTOR den Hypoxie-Signalweg verstärkt, ist aktuell noch nicht ausreichend geklärt. Vermutet wird eine Stabilisierung von HIF-1-alpha durch eine mTOR-Kinase vermittelte Modulierung.

1.2.3.3 Immunologische Bedeutung und Tumorsuppression

Die Zellen des Immunsystems werden ebenfalls von mTOR reguliert. Als Konsequenz besteht eine direkte Verbindung zwischen Immunantwort und Nährstoff-/Energieangebot im Organismus. Auch hier belegt die aktuelle Studienlage, dass verschiedenste immunologische Prozesse durch mTOR vermittelt werden. Hierzu zählt die Aktivierung, Differenzierung, Migration, Ausreifung, Cytokin- und Antikörperproduktion, sowie viele weitere immunologische Prozesse, die von den CD4+ -, CD8+ -, B-Zellen und Antigenprasentierenden-Zellen (APC) vermittelt werden ⁸². Dabei wirkt mTOR auf jeden Zelltyp individuell über ganz bestimmte, jeweils charakteristische Signalwege, die jedoch in ihrer Gesamtheit derart zahlreich und komplex sind, dass an dieser Stelle bewusst auf eine detaillierte Ausführung verzichtet wird. In diesem Kontext ist es jedoch durchaus sinnvoll, dass eines der Haupteinsatzgebiete von Rapamycin in der Transplantationsmedizin zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen liegt.

Der Phosphatase PTEN kommt eine wichtige Bedeutung in der Tumorsuppression zu. Ihre Funktion ist es, das unkontrollierte Zellwachstum zu unterbinden. Dies wird realisiert, indem sie PI3K und somit den Akt/PKB-Signalweg inhibiert und somit letztendlich die Aktivierung von mTOR hemmt. Zusammengefasst führt ein Verlust des PTEN-Gens mit konsekutiver Hochregulation von mTOR, wie oben beschrieben, zu verstärktem Zellwachstum, verringertem Proteinabbau, gesteigerter Angiogenese, sowie weiteren proliferativen Vorgängen, die das Tumorentstehen und -wachstum begünstigen. So wird davon

ausgegangen, dass die Dysregulation des PTEN-Akt/PKB –Signalwegs mit folgender Überexpression von S6K und eIF4E in Zusammenhang mit der Entstehung verschiedenster Malignome steht und das Auftreten von Mamma-, Ovarial-, Nieren-, Kolon- und Kopf-/Halstumore begünstigen kann ⁸³.

1.2.4. Pharmakologischer Einsatz von mTOR-Inhibitoren

1.2.4.1 Generelle Wirkungsweise von mTOR-Inhibitoren

Wie oben beschrieben bildet mTOR einen Komplex mit weiteren Proteinen/Enzymen, die als mTORC1 und mTORC2 bezeichnet werden. Wichtiger Teil von mTORC1 ist Raptor. Seine Bindung an mTOR, MLST8, DEPTOR und PRAS 40 aktiviert erst die Formierung des Komplexes mTORC1. Die Bindung von Raptor an die restlichen mTORC1 Bestandteile ist dabei von dem Enzym FK506-binding protein 12 (FKBP 12) abhängig. FKBP 12 gehört zu den Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen (PPIase). Diese Enzyme beeinflussen die Proteinfaltung, indem sie eine Achsenrotation des Proteinskeletts an einer Stickstoffbindung durchführen, an der die Aminosäure Prolin beteiligt ist. Rapamycin bildet einen Komplex mit FKBP 12, wodurch die Anbindung von Raptor an mTOR und somit die Wirkung von mTOR gehemmt wird ⁸⁴.

1.2.4.2 Allgemeine Indikationen und Limitationen von mTOR-Inhibitoren

Neben seinem pharmakologischen Einsatz nach Transplantationen zum Zwecke der Immunsuppression werden mit Rapamycin auch koronararterielle Stents beschichtet, um einer In-Stent-Restenose entgegen zu wirken. Anfängliche Hoffnungen in der Anwendung bei verschiedenen Krebsformen konnten sich jedoch nicht bestätigen ⁸⁵. Neue technologische Möglichkeiten führten zur Entwicklung von Rapamycin-Derivaten, den sogenannten niedermolekularen Inhibitoren. Dazu gehören Temsirolimus, Everolimus und Deforolimus, die für die antineoplastische Behandlung allesamt günstigere pharmokinetische Merkmale als Rapamycin besitzen. Temsirolimus und Everolimus werden beispielsweise in der Behandlung von Nierenzellkarzinomen eingesetzt. Everolimus zeigte sich prognostisch vorteilhaft in der Anwendung bei NETs des Pankreas ⁸⁶, sowie in der Behandlung von Lymphomen. Bei der Applikation sowohl bei Hodgkin-, als auch Non-Hodgkin-Lymphomen zeigte sich insgesamt eine Ansprechrate von 33%. Temsirolimus erzielte Ansprechraten von 36% beim diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom und 56% beim folliculären Lymphom. In der Behandlung von anderen soliden Tumoren konnten mit mTOR-Inhibitoren bislang keine zufriedenstellenden Ansprechraten erreicht werden ⁸⁷. Eine Ausnahme stellt hier die Behandlung von Sarkomen mit Deforolimus (=Ridaforolimus) dar, bei der eine statistisch signifikante Verzögerung der Tumorprogression festgestellt wurde. Unter den bekannten Nebenwirkungen von mTOR-Inhibitoren wie Stomatitis, Infektionen, Müdigkeit, Thrombozytopenie, Pneumonitis, Hyperglykämie und Hautausschlag konnte die Gesamtüberlebenszeit im Mittel von 85,3 auf 90,6 Wochen erhöht werden ⁸⁸.

Als einer der Gründe für die relativ eingeschränkte Wirksamkeit von mTOR-Inhibitoren konnte in neueren Studien der lange Zeit wenig beachtete mTORC2 ausgemacht werden. Es zeigte sich, dass mTORC2 über einen positiven Feedbackloop Akt phosphoryliert und aktiviert, wodurch im Gegenzug die mTORC1-Aktivität erhöht wird ⁸⁹. Die Aktivierung von mTORC2 läuft dabei zunächst auf gleichem Wege ab wie die von mTORC1. Wie beschrieben stellt Raptor den Hauptangriffspunkt der Rapamycinderivate dar. Dieses Protein ist jedoch nicht Bestandteil des Komplexes mTORC2. Somit wird durch die klassischen mTOR-Inhibitoren nur mTORC1 gehemmt, nicht aber mTORC2. Dieser reguliert jedoch über eine volle Akt-Aktivierung mTORC1 hoch. Dem wird versucht durch die Entwicklung einer zweiten Generation von mTOR-Inhibitoren entgegenzuwirken.

1.2.4.3. Spezielle Therapie mit mTOR-Inhibitoren bei NETs

Die Studienlage zur Behandlung von NETs mittels mTOR-Inhibitoren ist insbesondere aufgrund der unterschiedlichen Prävalenz der einzelnen Tumorgruppen sehr unterschiedlich. So haben sich mTOR-Inhibitoren bereits in der Therapie pankreatischer NETs bewährt. Die Behandlung mit Everolimus hat heute ihren festen Stellenwert in der Therapie und zeigt eine Verzögerung der Tumorprogression.

Bezüglich der Wirksamkeit von mTOR-Inhibitoren bei nicht-pankreatischen NETs wurden erst kürzlich die Ergebnisse der groß angelegten RADIANT-4-Studie (RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumours, Fourth Trial) publiziert. Hierbei wurde der Effekt von Everolimus auf das Wachstum nicht-hormonaktiver NETs der Lunge und des Verdauungstrakts analysiert. Ausgenommen wurden in dieser Studie pankreatische NETs, deren positives Ansprechen auf mTOR-Inhibitoren bereits vorbekannt war. Es konnte an einem Kollektiv aus 302 Patienten gezeigt werden, dass in der Everolimus-Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe das Progressions-freie Überleben von 3,9 auf 11,0 Monaten verlängert werden konnte⁹⁰. Korrespondierend zu der nur niedrigen Prävalenz von NETs des Magens allgemein waren nur 11 der 302 eingeschlossenen Patienten in der RADIANT-4-Studie von einem gastralen NET betroffen. Diese Subgruppe an Patienten wurde in dieser Studie nicht extra bezüglich der Wirksamkeit und definierter Endpunkte untersucht.

1.3. Therapie von NETs des Magens und Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits im Abschnitt „Therapie- und Präventionsstrategien“ beschrieben, stellt die lokale endoskopische Resektion der Neoplasien bzw. die chirurgische Resektion von befallenen Magenteilabschnitten oder des kompletten Magens die Therapie der Wahl dar. Insbesondere bei nicht metastasierten NETs ist die Entfernung im Gesunden prognostisch entscheidend. Aber selbst bei bereits metastasierten Karzinomen kann ein Debulking des Primärtumors Sinn machen. Auch die Resektion von einzelnen Metastasen, insbesondere in der Leber, kann, abhängig von Differenzierung und Hormonaktivität des Tumors, zur Erhöhung qualitätsadjustierter Lebensjahre beitragen⁹¹.

Die medikamentöse Therapie mit Somatostatin-Analoga wie beispielsweise Octreotid zur Reduktion der Gastrinproduktion wurde bereits bei lokal begrenzten Typ 1 und 2 NETs des Magens etabliert.

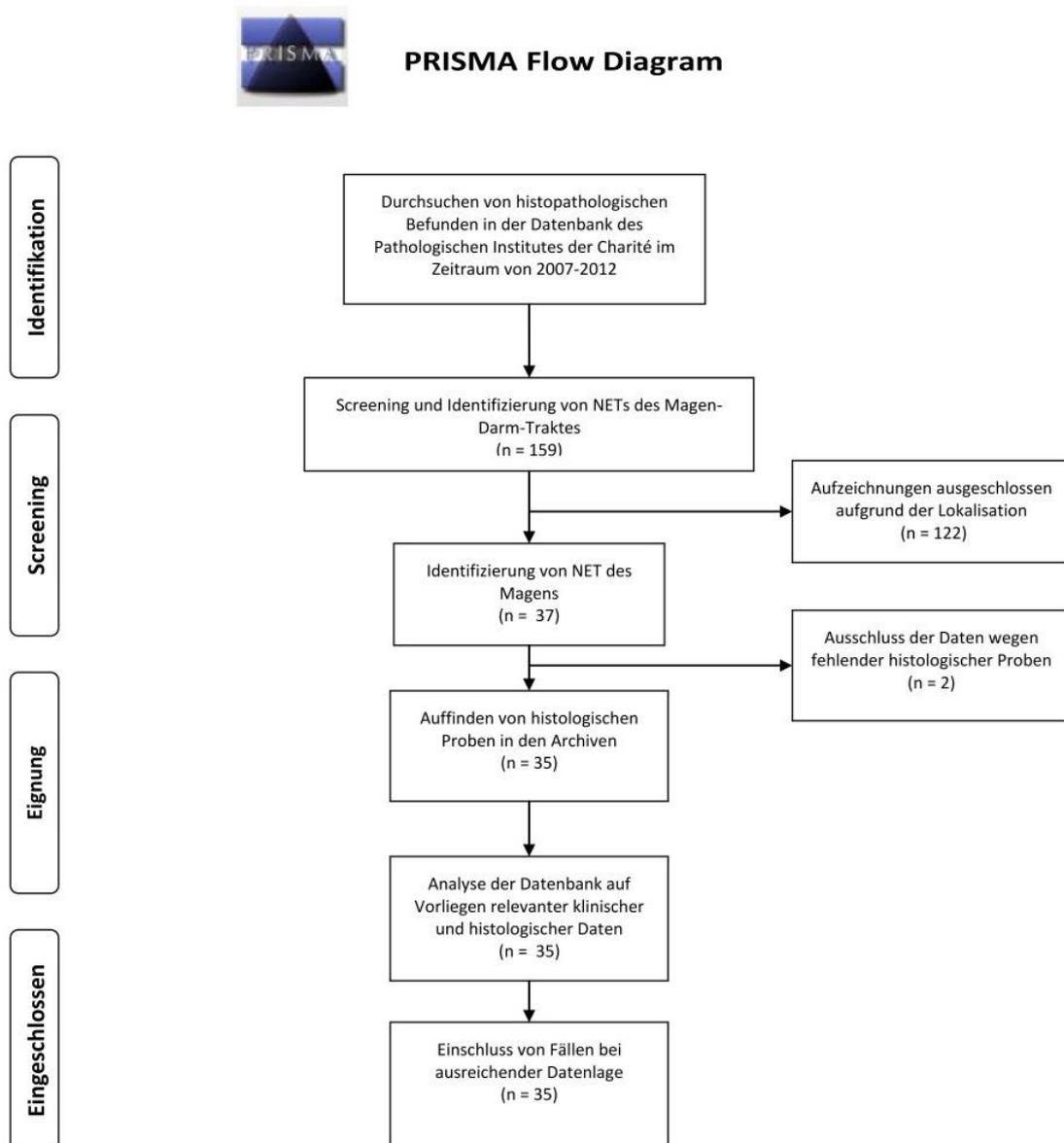
In der Behandlung von weiter fortgeschrittenen Magen NETs gibt es jedoch bisher keine klare Empfehlung und insbesondere nur wenig Erfahrung mit mTOR-Inhibitoren. Grund dafür ist unter anderem die aktuell noch kaum untersuchte Expression des mTOR-Pfades in Magen NETs. Dementsprechend gibt es hierbei aktuell keine eindeutige Empfehlung bzw. Genehmigung für den Einsatz von mTOR-Inhibitoren.

Ziel dieser Arbeit ist die Evaluation der Expression verschiedener Komponenten des mTOR- Pfades in NETs des Magens. Unsere Hypothese ist, dass bei Exprimierung von einzelnen Komponenten des mTOR-Pfades eine Wirksamkeit von mTOR-Inhibitoren prinzipiell wahrscheinlich ist. Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Wirksamkeit von mTOR-Inhibitoren in den speziellen NETs des Magens besser einschätzen zu können, um hieraus gegebenenfalls Grundlagen für prospektive klinische Studien zu schaffen und Therapieempfehlungen ableiten zu können.

2. Methodik

2.1. Patientendaten

Die Akquirierung der Patienten erfolgte im Rahmen einer retrospektiven Analyse über die Datenbank des Pathologischen Institutes der Charité. Zeitlich wurde eine Beschränkung auf einen Rahmen zwischen 2007 und 2012 festgelegt. Aus einer Sammlung an histologischen Auswertungen von NETs des Magen-Darm-Traktes (exklusive Pankreas) wurden die mit Nachweis eines gastralen NETs selektioniert. Zu 35 aus 37 histologischen Datensätzen mit Nachweis eines GNETs lagen in den Archiven des Pathologischen Institutes Paraffin-Blöcke vor. Zu allen 35 Fällen mit Nachweis eines GNETs lagen ausreichend histologische und klinische Daten vor, um die Patienten in die Analyse mit einzubeziehen.



From: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097

For more information, visit www.prisma-statement.org.

Abbildung 2: Darstellung der Datenakquise im Rahmen einer retrospektiven Analyse

2.2. Statistischer Zusammenhang zwischen den einzelnen Komponenten

Die folgenden Komponenten des m-TOR Pfadweges haben wir in unsere Analyse integriert und in jeder der 35 Proben erhoben: pPTEN, pTSC2, pPIK3CA (eine katalytische Untereinheit von PI3K), p4E-BP1, p-Akt und p-mTOR. Da in der aktuellen Literatur bereits beschrieben ist, dass diese Komponenten pathophysiologisch miteinander in Zusammenhang stehen, haben wir eine Analyse der statistischen Korrelation mittels Spearman Test der beschriebenen sechs Komponenten vor Allem als zusätzliche Qualitätskontrolle durchgeführt.

2.3. Einfluss verschiedener klinischer und pathologischer Faktoren

Im Rahmen unserer Analyse wurde der Zusammenhang verschiedener klinischer oder pathologischer Faktoren mit der Ausprägung der einzelnen sechs erhobenen m-TOR-Pfadwegkomponenten evaluiert, sowie eine Summe über alle sechs Komponenten gebildet. Hierzu zählten:

- Tumor-Grading: das Grading erfolgte anhand der pathologischen Stadien I (hoch differenziert), II (mäßig differenziert) und III (schlecht differenziert)
- Tumor-Typ: die Einteilung in Tumor-Typen erfolgte klinisch in die Typen 1-4 (ausführliche Beschreibung s. Einleitung Tabelle 3)
- ENETS-Stadium: die Einteilung erfolgte in die Tumor-Stadien 0-IV
- Vorhandensein einer Fernmetastasierung: diese Einteilung erfolgte klinisch in die zwei Gruppen Metastasierung vorhanden oder nicht vorhanden zum Zeitpunkt der letzten Patientenbefragung bzw. Sichten der in der Charité archivierten Arztbriefe (bis Juni 2016)
- Höhe des Ki-67%-Indizes: die Einteilung erfolgte in <2%, 2-20%, >20% anhand der pathologischen Schnitte
- Patientengeschlecht: männliche und weibliche Patienten wurden unterschieden
- Lokalisation: diese Einteilung erfolgte nach Lokalisation in Antrum, Corpus, Fundus oder diffuse Lokalisierung
- Vorhandensein einer Symptomatik: die Unterscheidung erfolgte nur quantitativ (Symptomatik vorhanden oder nicht; keine Wertung; für Details siehe Tabelle 1). Als vorhandene Symptomatik wurden insbesondere folgende Parameter gezählt: Magenschmerzen, Völlegefühl, Fatigue, B-Symptomatik
- Zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups konnte der klinische Verlauf von drei Patienten nicht erhoben werden

2.4. Statistische Auswertung

Die Angabe der Werte erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung bzw. absolute Anzahl (relative Ausprägung in %), soweit nicht anders angegeben. Die statistische Auswertung wurde mittels SPSS Statistics Version 20.0 durchgeführt. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde hierbei als statistisch signifikant definiert.

Die Auswertung der Korrelationen erfolgte mittels Spearman's Korrelation für die Komponenten pPTEN, pTSC2, pPIK3CA, p4E-BP1, p-Akt und p-mTOR, da es sich hierbei um eine binäre Ausprägung (ja, nein) und nicht um intervallskalierte Werte handelt. Bei 100% Positivität musste auf die statistische Analyse verzichtet werden und es erfolgte stattdessen eine deskriptive Auswertung.

Der Einfluss der verschiedenen klinischen Faktoren wurde bei Vorhandensein von 2 Gruppen (Metastasierung, Geschlecht Symptomatik) durch Fisher-Exakt Test untersucht. Bei Vorhandensein von mindestens 3 Gruppen (Grading, Tumor-Typ, ENETS-Stadium, Ki-67% Index, Lokalisation) wurde der Chi-Quadrat Test verwendet.

Als zusätzlicher Parameter wurde die Summe über das Vorhandensein der einzelnen Komponenten ermittelt (von 0-6), der eine Gesamtaussage zu den m-TOR Komponenten zulassen soll. Aufgrund der Ordinalskalierung wurde hierbei der Mann-Whitney U-Test bei Vorhandensein von 2 Gruppen (Metastasierung, Geschlecht, Symptomatik) verwendet, bei mehr als zwei Gruppen auf den Kruskal-Wallis Test zurückgegriffen (Grading, Tumor-Typ, ENETS-Stadium, Ki-67% Index, Lokalisation).

2.5. Histo-pathologische Aufarbeitung

Die Herstellung der Gewebe-Microarrays, für die immunohistochemische Analyse der mTOR Pfadweg-Expression, erfolgte mittels eines semiautomatischen Gewebe-Arrayers (Tissue Microarrayer TMA Grandmaster, 3DHitech, Budapest, Hungary), durch in der Handhabung des Gerätes geschultes Fachpersonal. Für jede Probe wurde ein repräsentativer mittels Formalin fixierter Paraffin-Block ausgewählt, welcher Tumorgewebe enthalten sollte. Das laboratorische Fachpersonal am Pathologischen Institut der Charité erstellte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte Schnitte aus den Gewebeproben. Tumor enthaltene Gebiete wurden auf beiden Seiten markiert. Sowohl die Auswahl des Gewebeblocks, als auch die Markierung von tumorenthaltenen Arealen wurde von einem Pathologen mit Spezialisierung in NET-Pathologie durchgeführt. Anschließend wurden ein oder zwei Gewebe-Kerne mit einem Durchmesser von 1 mm aus dem Tumor enthaltenem Gewebe ausgestanzt und auf einen sogenannten Donor-Paraffinblock übertragen. Die immunohistochemischen Gewebe-Microarray Abschnitte mit einer Dicke von 2-3 μm wurden von geschultem Personal geschnitten und mittels Antikörpern gegen p-mTOR (Ser2448) (clone 49F9, 1:100; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), pTSC2 (polyclonal, 1:100; Cell Signaling Technology), pAkt (polyclonal, 1:200; Abcam, Cambridge, MA, USA), p4EBP1 (clone 235B4, 1:100; Cell Signaling Technology), pPTEN (monoclonal, 1:100; Cell Signaling Technology) und pPIK3CA (1:100; Cell Signaling Technology) inkubiert. Das Weglassen des primären Antikörpers fungierte als Negativ-Kontrolle. Die Ki-67-Färbung (clone M7240, 1:100; Dako, Glostrup, Denmark) wurde auf den gesamten Objektträger aufgetragen. Die Färbung wurde in einem Benchmark XT Autostainer (Ventana, Tuscon, AZ, USA), durch Fachpersonal entsprechend dem Hersteller-Protokoll durchgeführt. Die Analyse der Gewebeproben wurde vom Autor durchgeführt und dann als positiv gewertet, wenn mindestens 50% der Tumorzellen eine moderate oder starke Expression des Ziel-Proteins aufwiesen.

3. Ergebnisse

3.1. Patientencharakteristika

Tabelle 4: Charakteristika der Patienten in unserem Kollektiv

| Charakteristikum | | | |
|-----------------------------------|---|---------------------|-------|
| <u>Basisdaten</u> | | | |
| Durchschnittsalter | | 60,7 | ±10,6 |
| Geschlecht | weiblich | 19 | (54%) |
| | männlich | 16 | (46%) |
| <u>Klinisch relevante Daten</u> | | | |
| Tumortyp * ¹ | 1 | 24 | (69%) |
| | 2 | 3 | (9%) |
| | 3 | 4 | (11%) |
| | 4 | 4 | (11%) |
| ENETS-Stadium 2010 * ² | 0 | 15 | (43%) |
| | I | 10 | (29%) |
| | II | 3 | (9%) |
| | III | 2 | (6%) |
| | IV | 5 | (14%) |
| M1-Stadium * ³ | Fernmetastasierung gesamt | 9 | (26%) |
| | Fernmetastasierung anteilig (Mehrfach- nennung möglich) | | |
| | hepatisch | 9 | 100% |
| | ossär | 2 | 22% |
| | andere | 2 | 22% |
| | keine Fernmetastasen | 26 | (74%) |
| Tumorlokalisation * ⁴ | Antrum | 3 | (9%) |
| | Corpus | 23 | (66%) |
| | Fundus | 2 | (6%) |
| | unspezifisch verteilt | 7 | (20%) |
| | Follow-up * ⁵ | komplette Remission | 15 |
| stabiler Befund | | 6 | (17%) |
| Progression | | 9 | (26%) |
| Tod | | 2 | (6%) |
| unbekannt | | 3 | (8%) |
| Symptomatik | nein | 27 | (77%) |
| | ja | 8 | (23%) |
| | | | |
| | | | |

| <u>Histopathologische Parameter</u> | | | |
|-------------------------------------|-------|----|--------|
| Grading | 1 | 23 | (66%) |
| | 2 | 8 | (23%) |
| | 3 | 4 | (11%) |
| Ki67% Index | <2% | 21 | (60%) |
| | 2-20% | 11 | (31%) |
| | >20% | 3 | (9%) |
| <u>Ausprägung der Komponenten</u> | | | |
| pPTEN | | 34 | (97%) |
| p4E-BP1 | | 31 | (89%) |
| p-Akt | | 23 | (66%) |
| p-mTOR | | 32 | (91%) |
| pTSC2 | | 35 | (100%) |
| pPIK3CA | | 35 | (100%) |

*¹ Einteilung in die vier Subtypen entsprechend der verschiedenen klinischen und pathologischen Charakteristika, genaueres siehe Kapitel 1.1.2.2.

*² Stadium 0 Carcinoma in situ, Tumorgröße weniger 0,5 cm, begrenzt auf Mukosa
 Stadium I Tumor infiltriert Lamina propria oder Submucosa und ist bis zu 1 cm groß
 Stadium II A Tumor infiltriert Muscularis propria oder Subserosa oder größer als 1 cm
 Stadium II B Tumor infiltriert die Serosa
 Stadium III A Tumor überschreitet die Serosa oder infiltriert andere Organe
 Stadium III B Nachweis von Lymphknotenmetastasen unabhängig von Tumorausdehnung
 Stadium IV Nachweis von Fernmetastasen unabhängig von Tumorausdehnung

*³ Die Evaluation der Fernmetastasierung erfolgte klinisch; Zeitpunkt des letzten Follow-ups Juni 2016

*⁴ Tumorproben wurden ubiquitär in der gesamten Magenschleimhaut entnommen; bei Angabe der Lokalisation wurden die Proben gezählt, bei denen in der pathologischen Analyse sicher neuroendokrine Tumorzellen nachgewiesen wurden

*⁵ Zeitpunkt des letzten Follow-ups der Patienten war Juni 2016; das Follow-up erfolgte telefonisch bzw. unter Analyse der Patientenepikrisen an der Charité bis Juni 2016

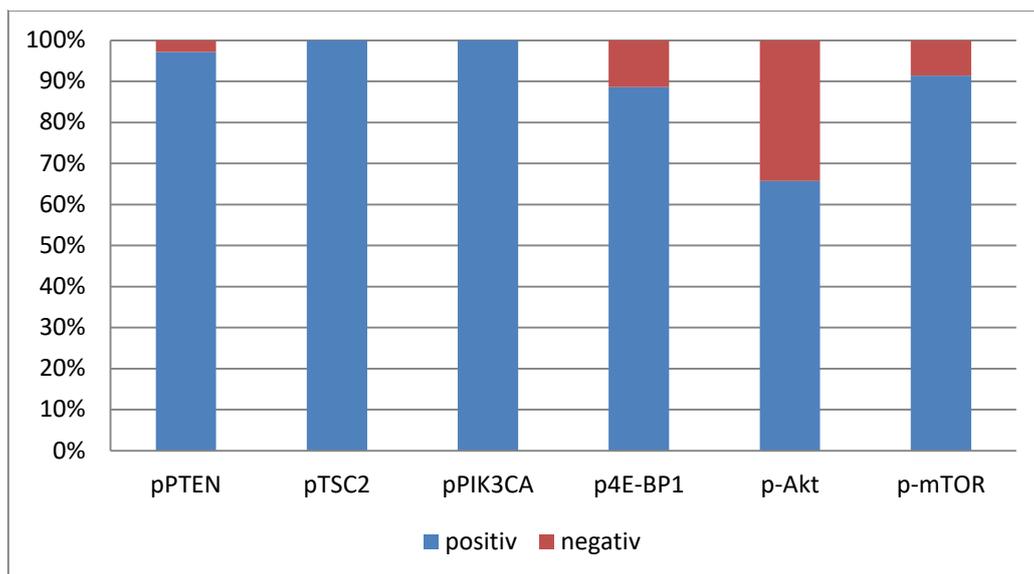
Die Patienten unseres Kollektivs mit nachgewiesenem neuroendokrinen Magentumor hatten ein durchschnittliches Alter von 60 Jahren. Die Männer-zu-Frauen Verteilung war nahezu ausgeglichen. Die meisten Tumoren ließen sich dem meist benignen Typ 1 zuordnen, nur bei den wenigsten Patienten lag zum Zeitpunkt der letzten Befragung eine Fernmetastasierung vor. Histopathologisch waren die meisten Tumoren gut differenziert (Grading I) und hatten einen geringen Ki67%-Index (<2%).

3.2. Korrelationen der erhobenen Komponenten des mTOR-Pfads untereinander

Alle 35 Patientendatensätze wurden als auswertbar klassifiziert und für die vorliegende Analyse verwendet. Für alle 35 Patienten wurden die folgenden Komponenten des m-TOR Pfadweges für die statistische Auswertung erhoben: pPTEN, pTSC2, pPIK3CA, p4E-BP1, p-Akt und p-mTOR.

Die beiden mTOR-Komponenten pTSC2 und pPIK3CA waren in allen 35 Proben positiv (**Abbildung 3**). Jeweils 34, 31, 23 und 31 Proben waren positiv für pPTEN (93%), p4E-BP1 (88%), p-Akt (67%) und p-mTOR (88%).

Abbildung 3: Ausprägung der Komponenten des mTOR-Pfades



Vergleich der Ausprägung der verschiedenen erhobenen m-TOR Pfadweg-Komponenten im 35 Patienten umfassenden Kollektiv. Alle Proben waren positiv für pTSC2 und pPIK3CA, wodurch eine statische Auswertung dieser Komponenten entfallen ist. Ein starker linearer Zusammenhang zeigte sich zwischen den Komponenten p-mTOR und p4E-BP1 ($p < 0,001$ und $R = 0,718$), ein ebenfalls linearer, aber schwacher Zusammenhang zwischen p-mTOR und pPTEN, sowie zwischen p4E-BP1 und pPTEN ($p = 0,004$ und $R = 0,477$ jeweils). Die statistische Auswertung erfolgte mittels Spearman`s Korrelation.

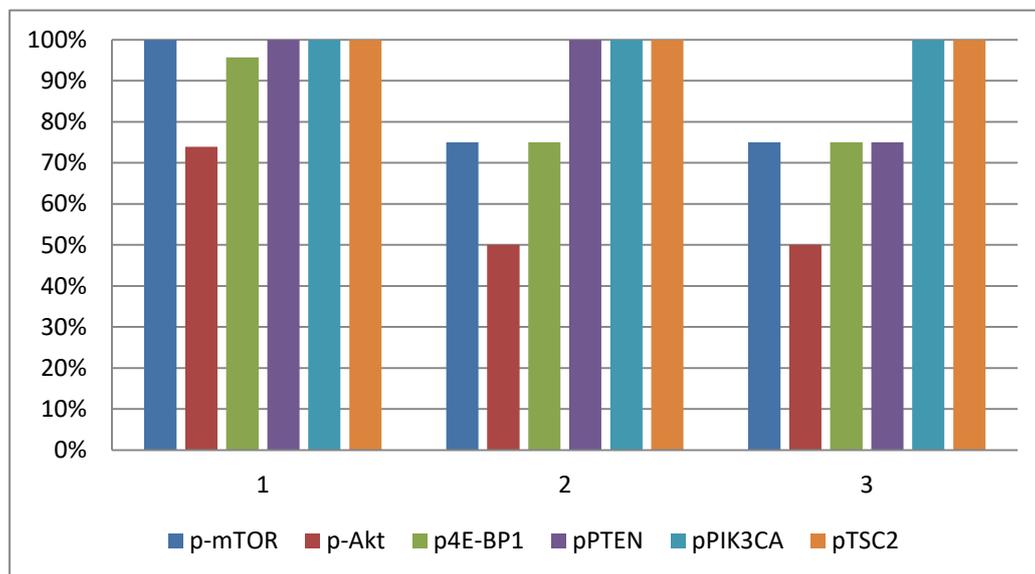
In unserer Stichprobe zeigte sich ein starker linearer Zusammenhang zwischen p-mTOR und p4E-BP1 ($p < 0,001$, $R = 0,718$), ein ebenfalls linearer, wenn auch weniger stark ausgeprägter Zusammenhang zwischen den Komponenten p-mTOR und pPTEN, sowie p4E-BP1 und pPTEN ($p = 0,004$ und $R = 0,477$ jeweils für beide Vergleiche). Ein lediglich schwach linearer statistischer Zusammenhang ließ sich zwischen den m-TOR Pfadweg-Komponenten p-mTOR und p-Akt ($p = 0,494$), zwischen p-Akt und p4E-BP1 ($p = 0,688$), sowie zwischen p-Akt und pPTEN ($p = 0,170$) ermitteln. Die Spearman`sche Korrelation zwischen den beiden Komponenten pTSC2 und pPIK3CA untereinander, sowie mit den übrigen 4 Komponenten des m-TOR-Pfadweges konnte aufgrund der Positivität in allen 35 Fällen nicht durchgeführt werden.

3.3. Einfluss verschiedener klinischer Faktoren auf die Komponenten des m-TOR Pfadweges

3.3.1. Einfluss des Tumor-Gradings

Informationen bezüglich des Tumor-Gradings lagen uns zu allen 35 Patienten vor, sodass alle Proben in die Analyse integriert wurden. Jeweils 23, 8 und 4 Patienten wurden zum Zeitpunkt der Datenerhebung in die Stadien I (hoch differenziert, 66%), II (mäßig differenziert, 23%) und III (schlecht differenziert, 11%) eingeordnet.

Abbildung 4: Einfluss des Gradings auf die Komponenten des mTOR Pfades



Ausprägung der verschiedenen m-TOR Pfadweg-Komponenten in Abhängigkeit vom Tumor-Grading. Jeweils 23, 8 und 4 Patienten wurden einem Grading von I (gut differenziert), II (mäßig differenziert) und III (schlecht differenziert) zugeordnet. Die Darstellung erfolgt als relative Ausprägung mit Angabe in % in Bezug auf die absolute Patientenzahl in der jeweiligen Gruppe. Mit zunehmendem Stadium des Gradings (abnehmende Differenzierung) zeigte sich eine verminderte relative Positivität der Komponenten p-mTOR und pPTEN ($p=0,043$ und $p=0,019$ jeweils; die statistische Analyse erfolgte mittels Chi-Quadrat Test). Die übrigen Komponenten p-Akt und p4E-BP1 zeigten dieselbe Tendenz, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p=0,368$ und $p=0,190$). Alle Proben zeigten eine positive Ausprägung für pPIK3CA und pTSC2, sodass diese Komponenten nicht in die statistische Auswertung integriert werden konnten und hierfür nur eine deskriptive Analyse durchgeführt wurde.

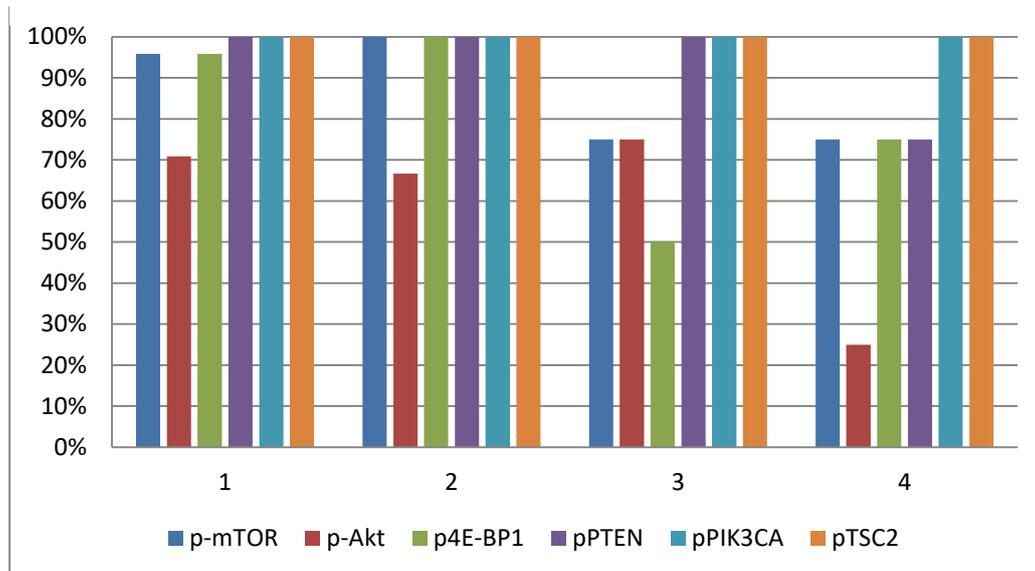
Mit zunehmender Entdifferenzierung in der pathologischen Auswertung (von Grading I bis III) nahm die Positivität von p-mTOR (von 100% in Stadium I auf 75% in den Stadien II und III; $p=0,043$) und pPTEN (von 100% für Grading I und II auf 75% bei Stadium III, $p=0,019$) in den Schnitten ab. Das Tumor-Grading zeigte keinen relevanten Einfluss auf die Positivität auf p-Akt ($p=0,368$) und p4E-BP1 ($p=0,190$), jedoch ließ sich mit zunehmendem Stadium die Tendenz einer Abnahme für die Positivität beider Komponenten erkennen (p-Akt: von 74% in Stadium I auf 50% in Stadium II und III und p4E-BP1: von 96% in Stadium I auf 75% in Stadium II und III). Der Einfluss des Gradings auf die Komponenten pPIK3CA und pTSC2 konnte nicht statistisch ausgewertet werden, da alle Proben eine positive Ausprägung hierfür zeigten.

Als zusätzlichen Parameter für die Gesamtausprägung haben wir die Einzelkomponenten summiert und den Einfluss des Gradings auf die Gesamtkomponentenausprägung evaluiert. Mit zunehmendem Grading zeigte sich eine Abnahme der Ausprägung der Gesamtkomponentenanzahl (siehe **Abbildung 4**; $p=0,047$).

3.3.2. Einfluss des Tumor-Typs

Informationen zum Tumor-Typ lagen uns ebenfalls zu allen 35 Patienten vor, sodass alle Proben in die Analyse integriert wurden. Die Tumoren wurden in 4 Typen eingeteilt, in die jeweils 23 (66%), 3 (9%), 4 (11%), 4 (11%) Proben eingeordnet wurden.

Abbildung 5: Einfluss des Tumortyps auf die Komponenten des mTOR Pfades



Ausprägung der verschiedenen m-TOR Pfadweg-Komponenten in Abhängigkeit vom Tumor-Typ. Jeweils 23, 3, 4 und 4 Patienten wurden den Tumor-Typen 1, 2, 3 und 4 zugeordnet. Die Darstellung erfolgt als relative Ausprägung mit Angabe in % in Bezug auf die absolute Patientenanzahl in der jeweiligen Gruppe. Mit zunehmendem Tumor-Typ zeigte sich eine verminderte relative Positivität der Komponenten p4E-BP1 und pPTEN ($p=0,041$ und $p=0,046$ jeweils; statistische Analyse mittels Chi-Quadrat Test). Die übrigen Komponenten p-mTOR und p-Akt zeigten dieselbe Tendenz, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p=0,304$ und $p=0,337$). Alle Proben zeigten eine positive Ausprägung für pPIK3CA und pTSC2, sodass diese Komponenten nicht in die statistische Auswertung integriert werden konnten und hierfür nur eine deskriptive Analyse durchgeführt wurde.

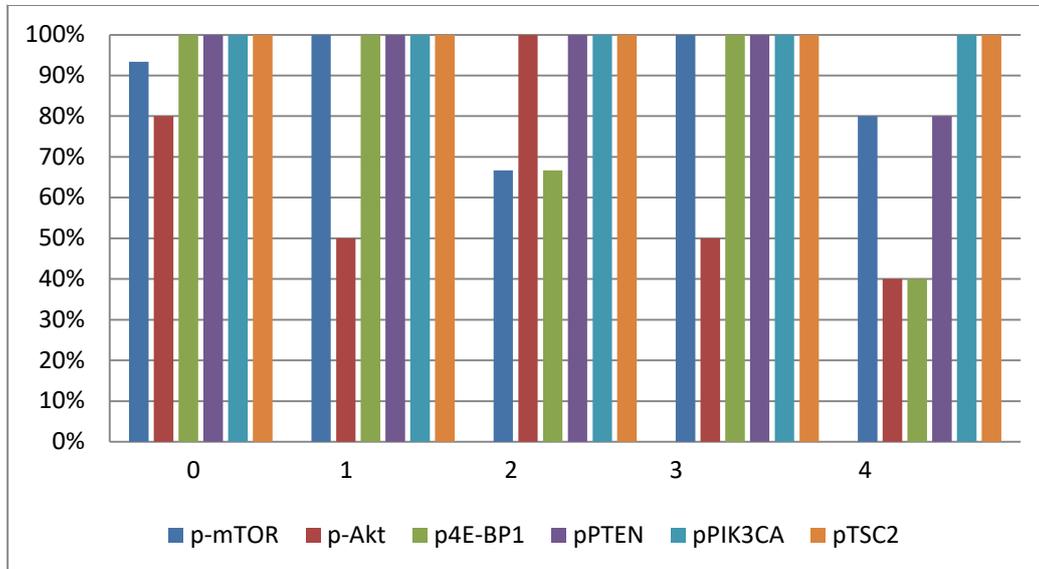
Mit zunehmendem Tumor-Typ in der pathologischen Auswertung (von 1-4) nahm die Häufigkeit der Positivität von p4E-BP1 (96-100% bei Typ 1 und 2 auf 50% bei Typ 3, leichter Anstieg auf 75% bei Typ 4; $p=0,041$) und pPTEN (von 100% Positivität bei den Tumor-Typen 1-3 auf 75% bei Typ 4, $p=0,046$) in den Schnitten ab. Der Tumor-Typ ließ keinen signifikanten Einfluss auf die Ausprägung von p-Akt ($p=0,337$) und p-mTOR ($p=0,304$) erkennen. Jedoch zeigte sich die diskrete Tendenz einer Abnahme der Positivität beider Komponenten in höheren Tumor-Typen (p-Akt: 67-75% bei Tumor-Typ 1-3 auf 25% in Tumor-Typ 4, sowie 96-100% Positivität von p-mTOR bei Tumor-Typ 1 und 2 versus 75% Positivität bei den Typen 3 und 4). Der Einfluss des Gradings auf die Komponenten pPIK3CA und pTSC2 konnte nicht statistisch ausgewertet werden, da alle Proben eine positive Ausprägung hierfür zeigten.

In dieser Kohorte zeigte der Tumortyp keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die summierte Komponentenanzahl als zusätzlich erhobenen Parameter für die Gesamtausprägung ($p=0,151$), jedoch die Tendenz einer Abnahme mit zunehmendem Typ (siehe **Abbildung 5**).

3.3.3. Einfluss des ENET-Stadiums

Informationen zum ENETS-Stadium lagen uns zu allen 35 Patienten vor, damit wurden alle Proben in die Analyse integriert. Die Tumoren wurden in 5 Stadien eingeteilt (0-IV), in die klinisch jeweils 15 (43%), 10 (29%), 3 (9%), 2 (5%) und 5 (14%) Patienten eingeordnet wurden.

Abbildung 6: Einfluss des ENET Stadiums auf die Komponenten des mTOR Pfades



Ausprägung der verschiedenen m-TOR Pfadweg-Komponenten in Abhängigkeit vom ENETS-Stadium des Tumors. Jeweils 15, 10, 3, 2 und 5 Patienten wurden den ENETS-Stadien 0-IV zugeordnet. Die Darstellung erfolgt als relative Ausprägung mit Angabe in % in Bezug auf die absolute Patientenzahl in der jeweiligen Gruppe. Mit zunehmendem ENETS-Stadium zeigte sich eine insgesamt tendenziell verminderte Ausprägung der Komponente p4E-BP1 ($p=0,002$; die statistische Analyse erfolgte mittels Chi-Quadrat Test). Die übrigen Komponenten p-mTOR, p-Akt und pPTEN zeigten eine ähnliche Tendenz, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p=0,358$, $p=0,222$ und $p=0,186$). Alle Proben zeigten eine positive Ausprägung für pPIK3CA und pTSC2, sodass diese Komponenten nicht in die statistische Auswertung integriert werden konnten und hierfür nur eine deskriptive Analyse durchgeführt wurde.

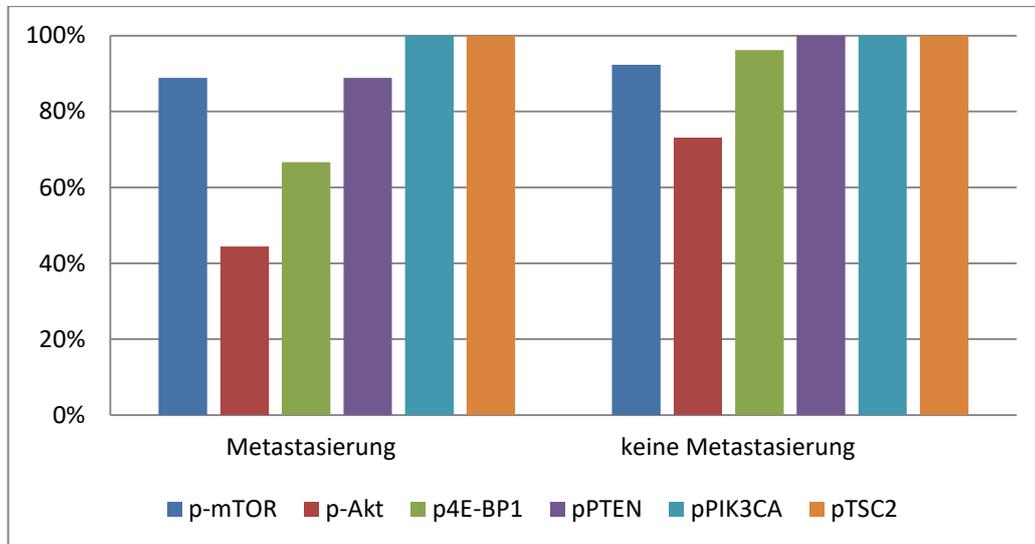
Mit zunehmendem ENETS-Stadium zeigte sich in der pathologischen Auswertung (von 0-IV) eine tendenzielle Abnahme der Häufigkeit der Positivität von p4E-BP1 (100% Positivität bei den ENETS-Stadien 0, I und III, 67% bei Stadium II und die geringste Positivität von 40% im Vergleich bei ENETS-Stadium IV; $p=0,002$). Alle übrigen Komponenten zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen ENETS-Stadien, allerdings zeigte sich die leichte Tendenz einer Abnahme für die Ausprägung der drei Komponenten p-mTOR, p-Akt und pPTEN bei höherem Tumor-Stadium (p-mTOR Positivität in den Stadien 0-IV 93%, 100%, 67%, 100%, 100%; $p=0,358$, für p-Akt jeweils 80%, 50%, 100%, 50% und 40% und für pPTEN eine Positivität von jeweils 100% in den Stadien 0-III, 80% in Stadium IV). Der Einfluss des Gradings auf die Komponenten pPIK3CA und pTSC2 konnte nicht statistisch ausgewertet werden, da alle Proben eine positive Ausprägung hierfür zeigten.

Ein höheres ENETS-Stadium war ebenfalls mit einer gering reduzierten summierten Komponentenausprägung assoziiert, allerdings war dieser Vergleich statistisch leicht subsignifikant ($p=0,057$) (siehe **Abbildung 6**).

3.3.4. Einfluss des Vorhandenseins von Fernmetastasen

Informationen zum Vorhandensein einer Fernmetastasierung lagen uns zu allen 35 Patienten vor, damit wurden alle Proben in die Analyse integriert. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung lag bei 9 Patienten eine Metastasierung vor (26% versus 26 Patienten; entsprechend 75%).

Abbildung 7: Einfluss der Metastasierung auf die Komponenten des mTOR Pfades



Ausprägung der verschiedenen m-TOR Pfadweg-Komponenten in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Fernmetastasen des Tumors. In unserem Patientenkollektiv lagen bei 9 Patienten bereits Metastasen vor. Die Darstellung erfolgt als relative Ausprägung mit Angabe in % in Bezug auf die absolute Patientenzahl in der jeweiligen Gruppe. Die Positivität von p4E-BP1 war höher bei Patienten ohne Fernmetastasierung im Vergleich zur Patientengruppe mit bereits eingetretener Metastasierung ($p=0,044$; die statistische Analyse erfolgte mittels Fisher-Exakt Test). Die übrigen Komponenten p-mTOR, p-Akt und pPTEN zeigten die gleiche Tendenz, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p=0,268$; $p=0,220$; $p=0,257$). Alle Proben zeigten eine positive Ausprägung für pPIK3CA und pTSC2, sodass diese Komponenten nicht in die statistische Auswertung integriert werden konnten und hierfür nur eine deskriptive Analyse durchgeführt wurde.

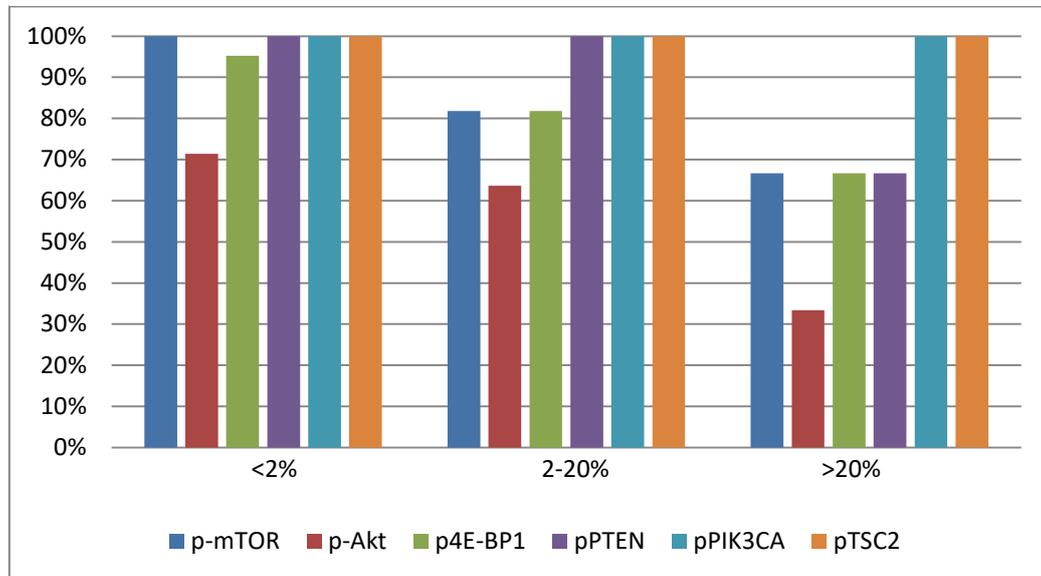
In unserem Patientenkollektiv war eine Fernmetastasierung mit einer signifikant geringeren Positivität von p4E-BP1 vergesellschaftet im Vergleich zu den Patienten, bei denen noch keine Fernmetastasierung zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups vorlag (96% versus 67% ohne Metastasierung im Vergleich zu Patienten mit bereits eingetretener Fernmetastasierung; $p=0,044$). Auch die Komponenten p-mTOR, p-Akt und pPTEN zeigten sich leicht gesteigert positiv bei Patienten ohne Fernmetastasierung (ohne Metastasen versus mit Metastasierung p-mTOR 92% versus 78% $p=0,268$; p-Akt 73% versus 44% $p=0,220$ und für pPTEN 100% versus 89% $p=0,257$). Ein Einfluss der bereits eingetretenen Fernmetastasierung auf die Komponenten pPIK3CA und pTSC2 konnte nicht statistisch ausgewertet werden, da alle Proben eine positive Ausprägung hierfür zeigten.

In unserem Patientenkollektiv war eine bereits eingetretene Fernmetastasierung ebenfalls mit einer reduzierten summierten Gesamtkomponentenanzahl verbunden ($p=0,023$) (siehe **Abbildung 7**).

3.3.5. Einfluss der Höhe von Ki67

Für die Auswertung des Einflusses des Ki67-Index, der in die Kategorien <2%, 2-20% und >20% eingeteilt wurde, lagen uns von allen Patienten Daten vor. In die jeweiligen pathologisch erhobenen Kategorien wurden jeweils 21, 11 und 3 Patienten (jeweils 60%, 31% und 9% entsprechend) eingeordnet.

Abbildung 8: Einfluss von Ki67 auf die Komponenten des mTOR Pfades



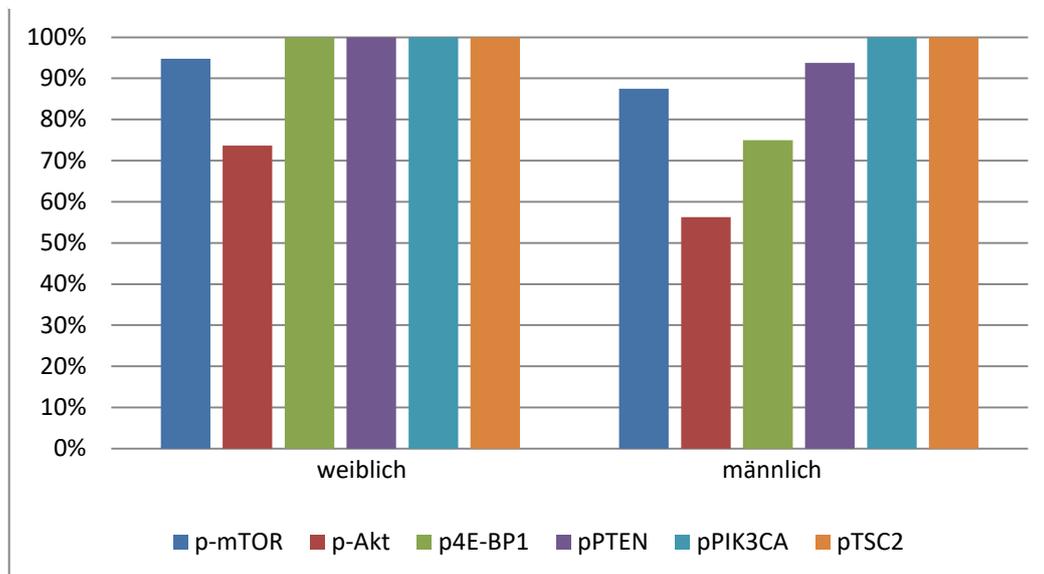
Ausprägung der verschiedenen m-TOR Pfadweg-Komponenten in Abhängigkeit von den verschiedenen pathologisch definierten Ki67%-Indexstadien: <2%, 2-20% und >20%. Jeweils 21, 11 und 3 Patienten wurden den jeweiligen Kategorien zugeordnet. Die Darstellung erfolgt als relative Ausprägung mit Angabe in % in Bezug auf die absolute Patientenanzahl in der jeweiligen Gruppe. Die Positivität von pPTEN war stärker bei Patienten mit höherem Ki67%-Stadium ($p=0,044$; die statistische Analyse erfolgte mittels Chi-Quadrat Test). Die übrigen Komponenten p-Akt, p4E-BP1 und p-mTOR zeigten sich ebenfalls diskret negativ bei zunehmendem Ki67%-Stadium, jedoch war der Vergleich ohne statistische Signifikanz ($p=0,423$, $p=0,242$; $p=0,060$). Alle Proben waren positiv ausgeprägt für pPIK3CA und pTSC2, sodass diese Komponenten nicht in die statistische Auswertung integriert werden konnten und deshalb hier nur deskriptiv dargestellt sind.

In unserem Patientenkollektiv zeigte sich bei Patienten mit höher ausgeprägtem Ki67%-Index eine verminderte Positivität der Komponente pPTEN ($p=0,044$; 100% Positivität in den Stadien 1 und 2 versus 67% in Stadium 3). Auch die Komponenten des m-TOR Pfadweges p-Akt ($p=0,423$; Positivität jeweils 71%, 64% und 33% in den Stadien 1, 2 und 3), p4E-BP1 ($p=0,242$; Positivität jeweils 95%, 82% und 67% in den Kategorien 1, 2 und 3 des Ki67%-Indizes) und p-mTOR ($p=0,060$; Positivität jeweils 100%, 82% und 67% in den Stadien 1, 2 und 3) zeigten sich weniger stark ausgeprägt bei höherem Stadium, jedoch ohne statistische Signifikanz. Ein Einfluss des Ki67%-Indizes auf die Komponenten pPIK3CA und pTSC2 konnte nicht statistisch ausgewertet werden, da alle Proben eine positive Ausprägung hierfür zeigten. Auf die summierte Gesamtkomponentenanzahl ließ sich kein statistisch signifikanter Einfluss vom Ki67%-Index evaluieren ($p=0,184$)(siehe **Abbildung 8**).

3.3.6. Einfluss des Patientengeschlechts

Es erfolgte ebenfalls die Auswertung des Einflusses des Patientengeschlechts auf die Ausprägung der m-TOR Pfadwegkomponenten, das uns bei allen Patienten vorlag. Somit wurde keine Probe aus dieser Analyse ausgeschlossen. 54% der in diese Arbeit eingeschlossenen Patienten waren weiblich und 46% männlich (n=19 versus n=16).

Abbildung 9: Einfluss des Geschlechts auf die Komponenten des mTOR Pfades



Ausprägung der verschiedenen m-TOR Pfadweg-Komponenten in Abhängigkeit von dem jeweiligen Geschlecht der Patienten. 19 Patienten unseres Kollektivs waren weiblich und 16 Patienten männlich. Die Darstellung erfolgt als relative Ausprägung mit Angabe in % in Bezug auf die absolute Patientenzahl in der jeweiligen Gruppe. Die Positivität von p4E-BP1 war stärker bei Frauen im Vergleich zu Männern ausgeprägt ($p=0,035$ die statistische Analyse erfolgte mittels Fisher-Exakt Test). Die Komponenten p-Akt, p-mTOR und pPTEN zeigten sich ebenfalls vermehrt positiv bei weiblichen im Vergleich zu männlichen Patienten, jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied ($p=0,311$, $p=0,582$ und $p=0,457$). Alle Proben waren positiv ausgeprägt für pPIK3CA und pTSC2, sodass diese Komponenten nicht in die statistische Auswertung integriert werden konnten und deshalb hier nur deskriptiv dargestellt sind.

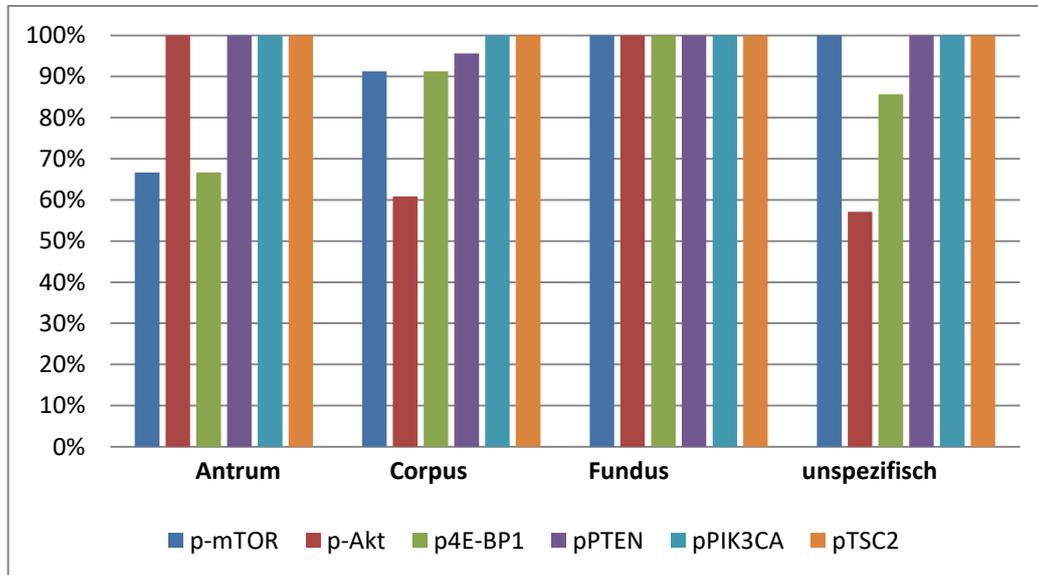
In unserem Patientenkollektiv zeigte sich bei weiblichen Patienten eine stärkere Positivität von p4E-BP1 im Vergleich zu männlichen Patienten (100% Positivität bei Frauen versus 75% bei Männern; $p=0,035$). Die gleiche Tendenz, nur ohne statistische Signifikanz, zeigte sich ebenfalls im Vergleich der Komponenten p-Akt, p-mTOR und pPTEN (p-Akt 74% bei Frauen versus 56% bei Männern; $p=0,311$, p-mTOR Positivität von 95% bei weiblichen Patienten versus 88% bei männlichen Patienten; $p=0,582$ und Positivität von pPTEN bei Frauen 100% versus 94% bei Männern; $p=0,457$). Der Einfluss des Patientengeschlechts auf die Komponenten pPIK3CA und pTSC2 konnte nicht statistisch ausgewertet werden, da alle Proben eine positive Ausprägung hierfür zeigten.

Auch in Bezug auf die Gesamtkomponentenanzahl zeigte sich eine stärkere Ausprägung bei weiblichen im Vergleich zu männlichen Patienten ($p=0,037$)(siehe **Abbildung 9**).

3.3.7. Einfluss der Tumorlokalisierung

Daten zur anatomischen Lokalisation der positiven Probe im Organ lagen uns zu allen Patienten vor, sodass keine Probe aus dieser Analyse ausgeschlossen wurde. Jeweils 3, 23, 2 und 7 Proben wurden im Antrum, Corpus und Fundus lokalisiert entnommen bzw. waren unspezifisch im Organ verteilt (jeweils 9%, 66%, 6% und 20% entsprechend).

Abbildung 10: Einfluss der Tumorlokalisierung auf die Komponenten des mTOR Pfades



Ausprägung der verschiedenen m-TOR Pfadweg-Komponenten in Abhängigkeit von der jeweiligen Lokalisation des Tumors im Organ. Bei jeweils 3, 23, 2 und 7 Patienten war der Tumor jeweils im Antrum, Corpus, Fundus lokalisiert bzw. unspezifisch im Organ verteilt. Die Darstellung erfolgt als relative Ausprägung mit Angabe in % in Bezug auf die absolute Patientenzahl in der jeweiligen Gruppe. Der Vergleich keiner der Komponenten p4E-BP1, p-Akt, p-mTOR und pPTEN zeigte einen statistisch relevanten Unterschied zwischen den Lokalisationen ($p=0,592$, $p=0,380$, $p=0,363$, $p=0,911$; die statistische Auswertung wurde mittels Chi-Quadrat Test durchgeführt). Alle Proben waren positiv ausgeprägt für pPIK3CA und pTSC2, sodass diese Komponenten nicht in die statistische Auswertung integriert werden konnten und deshalb hier nur deskriptiv dargestellt sind.

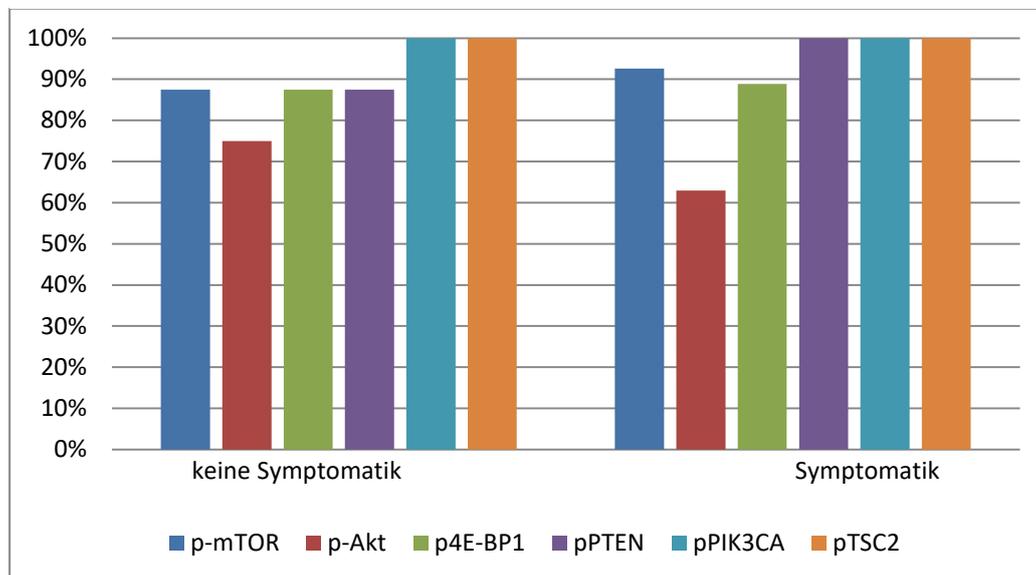
In unserem Patientenkollektiv zeigte sich kein statistisch signifikanter Einfluss der Tumorlokalisierung auf die Ausprägung der Komponenten p4E-BP1, p-Akt, p-mTOR und pPTEN (jeweils $p=0,592$, $p=0,380$, $p=0,363$, $p=0,911$). Der Einfluss der Lokalisation auf die Komponenten pPIK3CA und pTSC2 konnte nicht statistisch ausgewertet werden, da alle Proben hierfür positiv ausgeprägt waren.

Die Gesamtkomponentenanzahl blieb ebenfalls weitgehend unbeeinflusst von der Tumorlokalisierung ($p=0,654$)(siehe **Abbildung 10**).

3.3.8. Einfluss der Patientensymptomatik

Klinische Daten lagen uns ebenfalls zu allen Patienten vor, sodass wir alle Proben in diese Analyse integrieren konnten. Bezüglich der Symptomatik wurde rein quantitativ unterschieden, ob eine Symptomatik vorlag (ja, keine weitere qualitative Differenzierung erfolgt; n=8 entsprechend 23%) und mit den Patienten verglichen, die zum Zeitpunkt der Diagnostik komplett beschwerdefrei waren (n=27 entsprechend 77%).

Abbildung 11: Einfluss der Symptomatik auf die Komponenten des mTOR Pfades



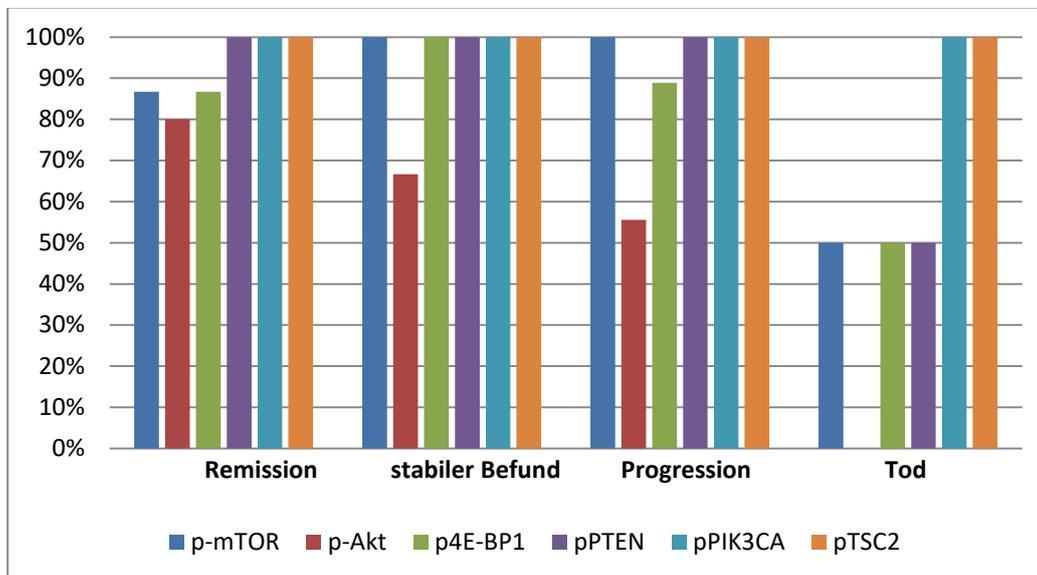
Ausprägung der verschiedenen m-TOR Pfadweg-Komponenten in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer mit dem Tumor vergesellschafteten Symptomatik. Bei 27 Patienten lag keine Symptomatik vor, 8 Patienten berichteten über Beschwerden. Die Darstellung erfolgt als relative Ausprägung mit Angabe in % in Bezug auf die absolute Patientenanzahl in der jeweiligen Gruppe. Das Vorhandensein einer Symptomatik zeigte keinen relevanten Einfluss auf die Ausprägung der verschiedenen Komponenten. So war bei Patienten mit Symptomatik p-Akt ($p=0,685$; die statistische Analyse erfolgte mittels Fisher-Exakt Test) etwas schwächer ausgeprägt, die Positivität von p4E-BP1 identisch in beiden Gruppen ($p=1,000$) und bei asymptomatischen Patienten die Positivität von pPTEN ($p=0,229$) und p-mTOR ($p=0,553$) geringer ausgeprägt als bei asymptomatischen Patienten. Alle Proben waren positiv ausgeprägt für pPIK3CA und pTSC2, sodass diese Komponenten nicht in die statistische Auswertung integriert werden konnten und deshalb hier nur deskriptiv dargestellt sind.

In unserem Patientenkollektiv zeigte sich kein statistisch signifikanter Einfluss der Patientensymptomatik auf die Ausprägung der m-TOR Pfadwegkomponenten. p-Akt war bei asymptomatischen Patienten etwas stärker positiv (asymptomatisch 75% versus symptomatisch 63% Positivität; $p=0,685$), die Positivität von p4E-BP1 hingegen identisch in beiden Gruppen (Positivität 89%; $p=1,000$). Bei asymptomatischen Patienten zeigte sich die Positivität von pPTEN und p-mTOR (pPTEN asymptomatisch 88% versus symptomatisch 100%; $p=0,229$ und p-mTOR asymptomatisch 88% versus symptomatisch 93% Positivität; $p=0,553$) geringer als bei symptomatischen Patienten. Der Einfluss der Patientensymptomatik auf die Komponenten pPIK3CA und pTSC2 konnte nicht statistisch ausgewertet werden, da alle Proben hierfür positiv ausgeprägt waren. Die Patientensymptomatik zeigte keinen signifikanten Einfluss, allenfalls die geringe Tendenz einer erhöhten Gesamtkomponentenausprägung bei den Patienten, bei denen zum Zeitpunkt des letzten Kontaktes noch keine Fernmetastasierung vorlag ($p=0,384$) (siehe **Abbildung 11**).

3.3.9. Einfluss des klinischen Verlaufs im Follow-up

Von 32 Patienten lagen uns zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups sichere Daten zum klinischen Verlauf vor (91%, 9% lost to Follow-up). Bei den 32 in die Analyse integrierten Patienten unterschieden wir zwischen kompletter Remission, einem stabilen Befund, der Progression und dem Versterben des Patienten. In diese Kategorien wurden jeweils 15 (43%), 6 (17%), 9 (26%) und 2 (6%) Patienten zugeordnet.

Abbildung 12: Einfluss des Follow-ups auf die Komponenten des mTOR Pfades



Ausprägung der verschiedenen m-TOR Pfadweg-Komponenten in Abhängigkeit von den verschiedenen klinischen Stadien im Verlauf: komplette Remission, stabiler Befund, Progression und Tod des Patienten. Jeweils 15, 6, 9 und 2 Patienten wurden in die beschriebenen Kategorien eingeordnet. Die Darstellung erfolgt als relative Ausprägung mit Angabe in % in Bezug auf die absolute Patientenanzahl in der jeweiligen Gruppe. Die Positivität von pPTEN war deutlich reduziert bei den Patienten, die bereits verstorben waren im Vergleich zu den übrigen Patienten ($p=0,002$; die statistische Analyse erfolgte mittels Chi-Quadrat Test). Die übrigen Komponenten p-Akt, p4E-BP1, p-mTOR ($p=0,230$; $p=0,385$; $p=0,165$) zeigten keinen statistisch relevanten Unterschied. Alle Proben waren positiv ausgeprägt für pPIK3CA und pTSC2, sodass diese Komponenten nicht in die statistische Auswertung integriert werden konnten und deshalb hier nur deskriptiv dargestellt sind.

In unserem Patientenkollektiv zeigte sich eine geringere Positivität von pPTEN bei den bereits verstorbenen Patienten im Vergleich zu den übrigen Patienten unseres Kollektivs (50% bei bereits verstorbenen Patienten versus 100% Positivität bei noch lebenden Patienten; $p=0,002$). Die übrigen Komponenten p-Akt, p4E-BP1 und p-mTOR waren ohne signifikanten Unterschied im Vergleich, zeigten jedoch ebenfalls die diskrete Tendenz einer geringeren Ausprägung bei ungünstigerer klinischer Situation (jeweils für die Verläufe komplette Remission, stabiler Befund, Progression und Tod p-Akt Positivität 80%, 67%, 56% und 0% mit $p=0,230$; p-P1 87%, 100%, 89%, 50% mit $p=0,385$ und p-mTOR 87%, 100%, 100%, 50% mit $p=0,165$). Der Einfluss des klinischen Follow-ups auf die Komponenten pPIK3CA und pTSC2 konnte nicht statistisch ausgewertet werden, da alle Proben hierfür positiv ausgeprägt waren.

Das klinische Follow-up war ebenfalls nicht mit einem statistisch eruiertem Unterschied in der summierten Gesamtkomponentenanzahl assoziiert ($p=0,285$)(siehe **Abbildung 12**).

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung

Unsere Arbeit demonstriert erstmals, dass NETs mit gastraler Lokalisation eine hohe mTOR-Aktivität aufweisen. Für die Überprüfung dieser Hypothese haben wir 6 verschiedene mTOR-Pfadweg-Komponenten und ihre Ausprägung in histopathologischen Präparaten von gastralen NETs untersucht: pPTEN, pTSC2, pPIK3CA, p4E-BP1, p-Akt und p-mTOR. Alle 6 Komponenten zeigten einen starken positiven linearen Zusammenhang.

Darüber hinaus konnten wir im Rahmen zusätzlich durchgeführter Substudien Unterschiede in der Ausprägung von einzelnen Pfadwegkomponenten, sowie der Summe der gesamten Komponentenzahl evaluieren, abhängig von verschiedenen klinischen und histopathologischen Parametern. So zeigten sich in histopathologischen Untersuchungen signifikant unterschiedliche Einflüsse auf die Ausprägung der mTOR-Pfadwegkomponenten. Beispielsweise war eine zunehmende Entdifferenzierung (Grading von Stadium 1-3 zunehmend) mit einer Abnahme der Positivität der Komponenten p-mTOR und pPTEN, sowie mit einer geringeren Ausprägung der Gesamtkomponentenzahl verbunden. Ebenfalls gab es einen Einfluss des Tumor-Typs auf die Komponentenausprägung. Ein höherer Tumor-Typ (Einteilung von 1-4 zunehmend) war durch eine Abnahme der Positivität von p4E-BP1 und pPTEN charakterisiert. Mit zunehmendem ENETS-Stadium (von 0-IV) zeigte sich eine Abnahme der Positivität von p4E-BP1. Bei Patienten mit höherem Ki67%-Index zeigte sich ebenfalls eine verminderte Positivität von pPTEN. Daneben wiesen auch klinische Parameter einen Einfluss auf die Komponentenausprägung auf. Eine schon zur Baseline oder im Laufe des Follow-ups vorhandene Fernmetastasierung war mit einer signifikant geringeren Positivität von p4E-BP1, sowie der Gesamtkomponentenzahl vergesellschaftet. pPTEN war ebenfalls geringer positiv bei den bereits verstorbenen Patienten in unserem Kollektiv. Interessanterweise konnte auch ein geschlechterspezifischer Unterschied beobachtet werden. Weibliche Patienten fielen im histopathologischen Präparat mit einer stärkeren Positivität von p4E-BP1, sowie der Gesamtkomponentenzahl im Vergleich zu männlichen Patienten auf.

4.2. Klinischer Kontext und Bedeutung der Einzelkomponenten

Wir gehen von der Annahme aus, dass eine hohe mTOR-Aktivität in Tumoren möglicherweise mit einer höheren Ansprechrate auf eine Therapie mit mTOR-Inhibitoren vergesellschaftet sein könnte. Hier sehen wir den zentralen klinischen Benefit dieser Arbeit, in der erstmals gezeigt wurde, dass gastrale NETs abhängig von weiteren histopathologischen und klinischen Charakteristika durch eine mehr oder weniger starke mTOR-Aktivität gekennzeichnet sind. mTOR-Inhibitoren werden routinemäßig bereits zur Therapie bestimmter Tumorentitäten eingesetzt. Unsere Studie zeigte, dass von diesem therapeutischen Ansatz möglicherweise ebenfalls Patienten mit gastral lokalisierten NETs profitieren könnten. Insgesamt ist die Studienlage bezüglich Therapieempfehlungen zu NETs des Magens aufgrund ihrer geringen Prävalenz stellenweise uneinheitlich. Aktuell gängige Therapieschemata beinhalten primär endoskopische bzw. operative Vorgehensweisen. Systemische Therapieoptionen, v.a. bei fortgeschrittenen Stadien, stehen derzeit jedoch nur begrenzt zur Verfügung. In unserer Studie konnte dargestellt werden, dass der Einsatz von mTOR-Inhibitoren einen zusätzlichen Behandlungsweg in der Therapie gastraler NETs darstellen könnte.

Wir sind davon ausgegangen, dass in Bezug auf individuell optimierte Therapiestrategien eine genaue Differenzierung und Betrachtung der Ausprägung der verschiedenen einzelnen mTOR-Komponenten von

besonderer Bedeutung sein könnte. Grund dafür ist, dass diese sich in ihrer spezifischen Rolle im m-TOR Pfadweg und bezüglich ihrer Stellung innerhalb der Aktivierungskaskade, einschließlich ihrer letztendlichen Wirkung auf die konkrete Proteinsynthese, bzw. in unserem Fall auf die Ausprägung und Verlauf der Tumorerkrankung, deutlich unterscheiden.

PTEN ist, wie in Kapitel 1.2.3.3. erwähnt, ein wichtiges Tumor-Suppressor Protein. Ein Verlust des PTEN exprimierenden Gens ist mit einer erhöhten Tumorrates vergesellschaftet. In unserer Auswertung zeigte sich, dass eine Minderexpression von PTEN insgesamt mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium eines eher entdifferenzierten und mit schlechter Prognose vergesellschafteten Tumorleidens einherging.

Akt spielt als Inhibitor des seinerseits inhibierenden TSC1/TSC2-Komplexes und des ebenfalls inhibierenden PRAS40 eine wichtige Rolle in der Aktivierung des mTORC1 Komplexes. Eine erhöhte Expression ließ sich bei unserer Auswertung in nur ca. 2/3 der Proben nachweisen. Tendenziell nahm die Akt- Expression bei Zunahme des Ki67-Index, Zunahme des ENETS Stadiums und Entdifferenzierung sowie Vorliegen von Fernmetastasen ab, wenn auch jeweils ohne statistische Signifikanz. Insgesamt deutet dies darauf hin, dass die Aktivierung des mTOR-Pfades, in prognostisch schlechteren Verläufen, mit aggressiveren Tumoren, nicht maßgeblich durch eine Akt vermittelte mTOR Hochregulierung abläuft.

4E-BP1 ist Teil des Downstream (siehe. Kap. 1.2.2.). 4E-BP1 ist in seiner nicht phosphorylierten Form aktiv und inhibiert eIF4E, welcher seinerseits ein zentraler Vermittler zwischen Ribosomen und mRNA ist. Durch eIF4E kommt es zur Bildung des Translationskomplexes und der Übersetzung der mRNA-Information am Ribosomen in eine Aminosäuresequenz, somit letztendlich zum Proteinaufbau. Phosphoryliertes 4E-BP1 (p4E-BP1) wird inaktiviert. Damit entfällt die Blockade von eIF4E, womit dieses essentielle Element des Proteinaufbaus seine Wirkung entfalten kann. In unserer Untersuchung sahen wir, dass abhängig vom Tumortyp (numerisch aufsteigend), bei ungünstigerem ENETS Stadium entsprechend mit Vorliegen von Metastasen, sowie bei weiblichem Geschlecht und im Antrum lokalisierten Entitäten p4E-BP1 statistisch signifikant vermindert ausgeprägt war. Ohne statistische Signifikanz, aber mit Tendenz zeigte sich bei zunehmendem Grading (abnehmende Differenzierung) und höherer Mitoserate (zunehmender Ki67-Index) auch hier eine geringere Positivität von p4E-BP1. Zu überlegen wäre gewesen, ob erhöhte p4E-BP1 Werte und damit eine vermeintlich erhöhte Proteinsynthese zu einem verstärktem Tumorwachstum und letztendlich schlechterer Prognose führen würden. Ein solcher Zusammenhang lässt sich jedoch nicht ableiten, es ist sogar ganz das Gegenteil der Fall. Aggressive Tumore mit schlechter Prognose scheinen sich unabhängig von der Downstream Regulierung zu verhalten und unterliegen somit eher nicht mehr dem mTOR Pfadweg. Hier scheinen andere Pathomechanismen für den Tumorprogress verantwortlich zu sein. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass erhöhte p4E-BP1 Werte bei günstigen Verläufen, mit letztendlich erhöhter Proteinsynthese, zu einer vermehrten Expression von Proteinen führen, die an der Zell-Apoptose beteiligt sind und so eher zum Tod von Tumorzellen führen.

mTOR ist eine Thyrosinkinase und Bestandteil des mTORC1-Komplexes. Über seine Kinasefunktion überträgt es Phosphatgruppen direkt auf andere Proteine. Es muss dazu selbst zunächst eine Phosphatgruppe aufnehmen, wodurch es zeitweise in seine aktive Form als p-mTOR gebracht wird, und kann anschließend diese Phosphatgruppe auf andere Proteine weitergeben. Hierzu gehören das oben erwähnte 4E-BP1 (welches darauf zu p4E-BP1 wird) und S6K1 (welches zu pS6K1 wird). Beide sind Bestandteile des Downstreams und direkt an der Proteinsynthese beteiligt. Ein vermehrtes Vorliegen von p-mTOR kann daher mit einer erhöhten Proteinsyntheserate assoziiert werden. Es zeigte sich in unserer Untersuchung für p-mTOR eine geringere Positivität bei geringer differenzierten Tumoren. Eine tendenziell geringere Ausprägung ohne jedoch statistische Signifikanz besteht bei numerisch aufsteigendem Tumortyp (Typ 1-4),

einem höherem ENETS Stadium sowie einem erhöhten KI67 Index und bei weiblichem Geschlecht. Wie bei allen zuvor untersuchten Komponenten scheint ein aggressiverer Tumorverlauf nicht maßgeblich vom mTOR-Kinase Pfad abhängig zu sein.

Für TSC2 und PIK3CA konnten keine statistischen Aussagen hinsichtlich des Tumorleidens getroffen werden, da beide Komponenten bei allen Proben immer ausgeprägt waren.

Die Ausprägung dieser Komponenten zeigte sich in unserer Analyse in den verschiedenen klinischen und histopathologischen Kontexten letztlich jedoch stets gleichermaßen und nie gegenläufig. Somit sind unsere sechs Komponenten in ihrer Wirkung als synergistisch zu betrachten.

Darüber hinaus haben wir im Rahmen unserer Analyse Subgruppenvergleiche zwischen verschiedenen klinischen und histopathologischen Faktoren durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass man bezüglich des mTOR Stoffwechsels und der Komponentenausprägung ebenfalls von interindividuellen Unterschieden ausgehen muss. Diese betreffen offensichtlich nicht nur histopathologische Aspekte, sondern ebenfalls klinischen Faktoren, wie z.B. das Geschlecht.

Der Vergleich in der Ausprägung von mTOR-Pfadwegkomponenten zwischen männlichen und weiblichen Patienten zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied. In unserem Kollektiv war eine Frauen-zu-Männer-Verteilung von nahezu 1:1 vorhanden (19 versus 16 Patienten). Ebenfalls gilt für beide Geschlechter gleichermaßen, dass bei den meisten Patienten der Tumor Typ 1 vorlag, bzw. sich der Tumor im ENETS-Stadium 0 oder I befand. Gleiches gilt für das Grading: in beiden Gruppen zeigte sich bei ca. 2/3 der Patienten in der histopathologischen Untersuchung ein Grading von I. Der Unterschied in der Anzahl an Gesamtkomponenten und p4E-BP1 im Speziellen zwischen den männlichen und weiblichen Patienten kann dementsprechend nicht in Zusammenhang mit einer unterschiedlichen Verteilung von histopathologischen Merkmalen wie dem Grading/Tumortyp gesehen werden, sondern liegt möglicherweise unterschiedlichen endokrinen oder stoffwechselphysiologischen Merkmalen zugrunde, die zwischen den verschiedenen Geschlechtern variieren. Auf die Unterschiede zwischen Männern und Frauen wurde bereits in Kapitel 1.1.3 hingewiesen. Schon in vorhergehenden Studien zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeitsverteilung von gastralen NETs in Anbetracht der Risikofaktoren (positive Familienanamnese, Diabetes mellitus) zwischen beiden Geschlechtern. Auch unsere Untersuchungen bestätigen einen Geschlechterunterschied und deuten auf eine enzymatische Ursache hin, die sich histopathologisch u.a. in der Ausprägung des mTOR Pfadweges widerspiegelt. Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass es Unterschiede in der enzymatischen Ausprägung der in den mTOR-Pfadweg involvierten Enzyme gibt oder geschlechterspezifische Unterschiede im Aktivierungs- oder Inaktivierungsverhalten vorliegen.

Ähnliches konnte bisher im Rahmen von Stoffwechselerkrankungen wie z.B. der koronaren Herzkrankheit gezeigt werden. Hierbei stellte sich geschlechterspezifisch ein unterschiedliches Stoffwechselverhalten dar, resultierend in der Ableitung verschiedener Therapieansätze bzw. individuell angepasster Therapieschemata für männliche und weibliche Patienten^{92, 93}. Ähnliche Kausalitäten könnten auch den NETs zugrunde liegen. Dies müsste zukünftig in größer angelegten Studien untersucht werden. Möglicherweise besteht auch hier ein Bedarf an individualisierten Therapieansätzen nicht nur für unterschiedliche histopathologische oder klinische Merkmale, sondern ebenso für die beiden jeweiligen Geschlechter. Eine Herausforderung für die Durchführung methodisch guter Studien bleibt hierbei, dass es sich bei den gastralen NETs noch immer um seltene Tumore mit geringer Prävalenz handelt.

Insgesamt könnte bei entsprechenden Patienten mit gastralen NETs ein alternatives Therapieschema mit mTOR-Inhibitoren diskutiert werden, was insbesondere aufgrund der gestiegenen Inzidenz und der aktuell noch sehr spärlichen Studienlage zu gastralen NETs klinisch relevant ist. Zusammenfassend ergibt sich im

Hinblick auf individuell optimierte Therapieschemata für die NETs des Magens folgende Hypothese: Aufgrund der geringeren Ausprägung von mTOR-Pfadwegkomponenten bei weniger gut differenzierten Tumoren, bei fortgeschrittenen Tumorstadium, einem höherem Ki-67%-Index oder bei weiblichen Patienten sollten nach Möglichkeit weiterhin konventionelle Therapieansätze verwendet werden. Der Gebrauch von mTOR-Inhibitoren könnte sich insbesondere als vorteilhaft erweisen bei männlichen Patienten, früheren Tumorstadien, guter histopathologischer Differenzierung und einem kleinerem Ki-67% Index, sofern ein konventionelles Vorgehen nicht möglich ist. Die Durchführung weiterer Studien zur Überprüfung dieser Hypothese ist jedoch notwendig.

4.3. Vergleich mit anderen aktuellen Studien

In dieser Arbeit wurden erstmals spezifisch die sehr seltene Gruppe der neuroendokrinen Tumore des Magens in Hinblick auf den mTOR Pathway untersucht. Ein Vergleich mit anderen Studien fällt daher sehr schwer, da sich keine Studie finden lässt, in der ein gleiches Vorgehen beschrieben wurde. Die jedoch zahlreichen Studien und Metaanalysen hinsichtlich des mTOR Pfades bei neuroendokrinen Tumoren jedweder Lokalisation beleuchten ausgiebig die Aktivität, Expression und prädiktive Faktoren für ein Ansprechen auf mTOR-Inhibitoren.

Zusammenfassend lässt sich dabei sagen, dass in allen neuroendokrinen Tumorentitäten der mTOR Pathway hochreguliert oder aktiviert war⁹⁴. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen unserer Arbeit. Ob sich aus einer erhöhten mTOR Aktivität jedoch auch eine therapeutische Empfehlung ableiten lässt, kann derzeit nicht mit letzter Sicherheit geklärt werden. Prädiktive Marker für eine präzise prognostische Aussage zur Wirksamkeit einer Therapie mit den durchaus nicht günstigen und nicht selten mit Nebenwirkungen behafteten mTOR Inhibitoren stehen derzeit nicht zur Verfügung⁹⁵. Jedoch zeigten Erfahrungswerte, dass bei der Therapie von pNETs mit Everolimus das progressionsfreie Überleben deutlich verlängert werden konnte. Es folgten daher klinische Studien, die klären sollten, wie sich das progressionsfreie Überleben von Patienten mit Nicht-pNETs unter einer Therapie mit Everolimus verhält. Die bereits erwähnte RADIANT-4 Studie ist die bislang Größte dieser Art. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es unter einer Therapie mit Everolimus zu einem signifikanten Anstieg des progressionsfreien Überlebens kommt bei gleichzeitig therapiebedingten milden bis moderaten Begleitscheinungen (Stomatitis, Infektionen, Diarrhöe, Ödeme, Fatigue). Jedoch wurden hierbei die Tumorentitäten des Gastrointestinal-Traktes zusammen mit denen des bronchopulmonalen Systems betrachtet. Dabei hatten von den 302 eingeschlossenen Patienten mit NET ca. 30% einen pulmonalen Ursprung. Auch wenn aus embryologischer Sicht der Verdauungs- und Atmungstrakt aus einem gemeinsamen Keimblatt, dem Endoderm, hervorgehen, sowie die Zellen des DNES gemeinsam dem Neuroektoderm entstammen, präsentieren sich gastrointestinale und pulmonale NETs in der Klinik sehr unterschiedlich. Eine Differenzierung zwischen gastrointestinalen und pulmonalen Tumoren im Hinblick auf die Therapieeffektivität von mTOR Inhibitoren erscheint sinnvoller als die gemeinsame Betrachtung beider Entitäten. In der gastrointestinalen Subgruppenanalyse von Singh et al. erfolgte ca. ein Jahr nach Erscheinen der Studie schließlich erstmals eine getrennte Evaluation⁹⁶. Es zeigte sich dabei, dass das progressionsfreie Überleben in der Everolimus Gruppe 13,1 Monate betrug, während es in der Placebo-Vergleichsgruppe bei 5,4 Monaten lag, womit durchschnittlich ein progressionsfreies Überleben von 7,7 Monaten erzielt werden konnte. Ferner wurde zur Minimierung des statistischen Effekts kleiner Subgruppen mit nur wenig Fallzahlen, wie z.B. beim Magen und Jejunum, eine Unterteilung in zwei große Subgruppen unternommen. Es wurde in eine Gruppe mit Tumorursprung im Mitteldarm und eine Gruppe dessen Tumorursprung außerhalb des Mitteldarms liegt untergliedert. Bei der Gruppe mit Nicht-Mitteldarm Tumoren, wozu die Magen-NETs zählen, zeigte Everolimus ein verlängertes progressionsfreies Überleben von 6,2 Monaten und eine 73%ige Verringerung des Risikos für einen Progress oder Tod. Anzumerken ist

jedoch, dass von den 60 Patienten in der Nicht-Mitteldarm Gruppe nur 11 Patienten einen NET des Magens aufwiesen und von diesen 11 wiederum nur 7 in der Everolimusgruppe waren. In wie weit also die Ergebnisse der RADIANT-4 Studie auf Patienten mit einem neuroendokrinen Tumor des Magens übertragbar sind, kann nicht mit letzter Sicherheit beurteilt werden. Insgesamt deutet jedoch vieles daraufhin, dass es eine ausgeprägte Aktivität des mTOR-Pfades in sämtlichen NETs gibt, einschließlich denen des Magens. Unsere Arbeit konnte diese Vermutung ebenfalls untermauern. Ob eine Therapie mit mTOR-Inhibitoren im individuellen Fall einen prognostischen Vorteil bringt, kann derzeit jedoch nicht vorhergesagt werden.

4.4. Limitationen und Stärken unserer Arbeit

Diese Arbeit wurde als retrospektive Studie durchgeführt mit einem relativ kleinen Patientenkollektiv von n=35. Diese Patienten wurden in einem singulären Zentrum mit dem Setting eines Universitätsklinikums (Charité Universitätsmedizin Berlin; Station für Innere Medizin, Gastroenterologie und Infektiologie) eingeschlossen.

Herausforderung der zu untersuchenden Erkrankung allgemein ist, dass es sich um eine sehr seltene Entität mit entsprechend geringer Prävalenz handelt. Aus diesem Grund kann eine große randomisierte doppelt verblindete Studie in diesem Kontext nur schwer durchgeführt werden. Die Charité Universitätsmedizin Berlin verfügt über ein spezialisiertes Zentrum für neuroendokrine Erkrankungen und ist seit 2009 von der Europäischen Gesellschaft für Neuroendokrine Tumoren (ENETS) als erstes Exzellenzzentrum für neuroendokrine Tumore europaweit zertifiziert worden. Dementsprechend kann von einer im Vergleich zu anderen Kliniken relativ hohen Fallzahl an Patienten ausgegangen werden. Soweit bekannt wurden jene Patienten an der Charité mit einem von 2007 bis 2012 diagnostizierten gastralen NET (histopathologisch gesichert und entsprechendes histologisches Material vorliegend) retrospektiv eingeschlossen, was in der Summe trotzdem ein sehr übersichtliches Patientenkollektiv von knapp mehr als 30 Patienten ergeben hat. Wir haben aus diesem Patientenkollektiv das Höchstmaß an Informationen eruiert und eine weiterführende Subgruppenanalyse unter Berücksichtigung aller von uns erhobenen klinischen und histopathologischen Charakteristika durchgeführt.

Im Rahmen unserer Subgruppenanalysen haben wir verschiedene klinische und histopathologische Parameter untersucht, welche möglicherweise nicht vollständig getrennt und unabhängig voneinander betrachtet werden können. Beispielsweise waren bei allen Patienten, die im Follow-up verstorben sind, bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose Fernmetastasen vorhanden, bei den übrigen Patienten lag nur in ca. 1/5 der Fälle initial eine Fernmetastasierung vor. Vergleicht man zum Beispiel Patienten mit bereits eingetretener Fernmetastasierung mit Patienten ohne Fernmetastasen bzgl. ihres Gradings und ihres Tumorstadiums, zeigen sich auch hier relevante Differenzen, die eine komplett unabhängige Betrachtung ausschließt. Ca. 80% der Patienten mit Fernmetastasen zeigten histopathologisch ein Grading von II oder III, bei Patienten ohne Fernmetastasierung war in 80% der Fälle ein Grading von I nachweisbar. Dasselbe gilt für den Tumortyp. Bei nahezu der Hälfte der Patienten mit bereits eingetretener Fernmetastasierung zeigte sich ein Tumortyp 4, ca. 85% der Patienten ohne Fernmetastasen zeigten in der histopathologischen Untersuchung einen Tumortyp 1. Es gibt also in unserem Kollektiv einen Zusammenhang zwischen der Fernmetastasierung, dem Follow-up, dem Grading und dem Tumortyp. Patienten mit einem klinisch fortgeschrittenerem Tumorstadium und schnellem Verlauf zeigen häufig in der histopathologischen Untersuchung ebenfalls einen maligneren, entdifferenzierteren Befund.

Insgesamt ist aufgrund der nur geringen Patientenzahl auch nur von einer eingeschränkten Aussagekraft der statistischen Auswertung auszugehen. Es müssen insbesondere die grenzwertig statistisch signifikanten Werte (p -Wert nur knapp unterhalb 0,05) als eingeschränkt aussagefähig betrachtet werden. Vor diesem Hintergrund können keine therapeutischen Strategien, insbesondere in den fortgeschrittenen Stadien, von denen in unserer Studie nur vergleichsweise wenige eingeschlossen werden konnten, sicher abgeleitet werden. Nichtsdestotrotz haben wir, in Kenntnis des nur geringen Patientenkollektives, unsere statistischen Tests so ausgewählt, dass die nur kleine Fallzahl auf die statistische Aussagekraft einen möglichst geringen Einfluss hat.

Für zukünftige Untersuchungen wäre es interessant, entsprechende Hypothesen, die sich aus der Auswertung dieses kleinen unizentrischen Patientenkollektives ergeben, in einem größeren Setting zu testen. In einem ersten Schritt könnte eine groß angelegte retrospektive Studie durchgeführt werden, die den Vorteil hat, dass man das Patientenkollektiv maximieren kann. Sinnvoll wäre insbesondere in Hinblick auf die Maximierung des Patientenkollektives, mehrere Zentren in eine solche Auswertung zu integrieren. Mit einem entsprechend größeren Patientenkollektiv könnte dann auch die Durchführung einer prospektiv angelegten klinischen Studie in einem nächsten Schritt diskutiert werden. Hierbei könnten Patienten entweder eine zusätzliche Therapie mit mTOR-Inhibitoren zum konventionellen Schema erhalten und dieses Vorgehen mit einer rein konventionellen Therapie verglichen werden, beispielsweise im Rahmen einer randomisierten kontrollierten klinischen Studie.

4.5. Schlussfolgerung

Es existiert eine hohe Aktivierung von mTOR-Komponenten in gastralen NETs mit einer hohen Korrelation der einzelnen Komponenten untereinander. Hieraus lässt sich ableiten, dass pharmakologische mTOR-Inhibitoren eine mögliche zusätzliche therapeutische Strategie in der Behandlung von gastralen NETs darstellen können. Es existieren interindividuelle Unterschiede in Abhängigkeit von histopathologischen und klinischen Charakteristika, die bei entsprechender Therapie berücksichtigt werden sollten, um eine optimale Therapie von Patienten mit diesem seltenen Tumor zu ermöglichen. Dabei deutet insgesamt Vieles daraufhin, dass gut differenzierte, sich in einem frühen Tumorstadium befindliche gastrale NETs eine erhöhte mTOR Pfadwegkomponenten- Ausprägung zeigen und damit eher einer Therapie mit mTOR Inhibitoren zugänglich wären. Fortgeschrittene Tumore zeigen sich eher unabhängig von der mTOR Regulation. Eine medikamentöse Inhibierung erscheint unter diesen Aspekten im Hinblick auf eine Tumorthherapie bei fortgeschrittenen Tumoren weniger erfolgsversprechend zu sein.

5. Anhang

Anonymisierte und randomisierte tabellarische Auflistung der jeweiligen demographischen, klinischen und histopathologischen Daten der Patienten

| Geburtsjahr | m/w | Lokalisation | Tumortyp | Grading G | Ki67-Index | Erstdiagnose | Symptomatik | Fernmetastasierung | Therapie | Verlauf | Follow-Up bis |
|-------------|-----|-------------------|----------|-----------|------------|--------------|----------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------|---------------|
| 1958 | w | Corpus | 1 | 1 | 1,00% | 2004 | keine | keine | Unbekannt | Remission | 06/2014 |
| 1941 | m | Corpus | 3 | 2 | 2,00% | | keine | keine | Unbekannt | Remission | 01/2006 |
| 1954 | m | Diffus | 1 | 1 | 2,00% | 2011 | keine | Hepatisch | Unbekannt | Progress | 08/2015 |
| 1938 | w | Fundus | 4 | 3 | 2,00% | 2007 | Tumorkachexie | Hepatisch | Gastrektomie | Stabile Disease | 01/2015 |
| 1951 | w | Corpus | 1 | 3 | 2-4% | 2005 | keine | keine | Gastrektomie | Stabile Disease | 04/2015 |
| 1960 | w | Antrum und Corpus | 1 | 2 | 2-10% | 2010 | keine | keine | Endoskopische Resektion | Remission | 02/2012 |
| 1959 | w | Corpus | 1 | 1 | 1,00% | | keine | keine | Unbekannt | Unbekannt | |
| 1965 | w | Corpus | 1 | 1 | 2-3% | 2010 | Magenschmerzen | keine | Endoskopische Resektion | Remission | 11/2012 |
| 1968 | m | Corpus | 1 | 1 | 1% | 2006 | keine | keine | Endoskopische Resektion | Remission | 10/2006 |
| 1946 | w | Antrum | 1 | 1 | 5,00% | 1998 | Magenschmerzen | keine | Endoskopische Resektion | Stabile Disease | 01/2008 |
| 1948 | m | Corpus | 4 | 2 | 30,00% | 2008 | keine | Hepatisch | Octreotid | Progress | 02/2010 |
| 1956 | m | Corpus | 4 | 3 | 25,00% | 2009 | Abdominale Schmerzen | Hepatisch, Peritoneal | Gastrektomie | Tod | 06/2010 |
| 1953 | w | Corpus | 1 | 1 | 1% | | keine | keine | Unbekannt | Remission | 01/2010 |
| 1957 | m | Corpus | 3 | 2 | 15-20% | 2011 | keine | Hepatisch, Ossär | Radiopeptidrezeptortherapie | Progress | 03/2016 |
| 1961 | w | Corpus | 1 | 1 | 1,00% | 2008 | keine | keine | Endoskopische Resektion | Remission | 09/2009 |
| 1971 | w | Antrum | 1 | 2 | 2,00% | 2010 | keine | keine | Endoskopische Resektion | Remission | 01/2010 |
| 1941 | m | Antrum | 3 | 2 | 10,00% | 2011 | keine | keine | Gastrektomie | Remission | 04/2015 |
| 1930 | w | Corpus | 2 | 1 | 2% | 1986 | keine | Hepatisch | Unbekannt | Unbekannt | |
| 1934 | m | Corpus | 1 | 1 | 2,00% | 2007 | Abdominale Schmerzen | keine | Gastrektomie | Remission | 09/2011 |
| 1962 | w | Corpus | 1 | 1 | 2% | 2004 | Magenschmerzen | keine | Unbekannt | Remission | 07/2011 |
| 1958 | w | Antrum und Corpus | 1 | 1 | 5,00% | 2000 | keine | keine | Unbekannt | Stabile Disease | 09/2009 |
| 1941 | m | Corpus | 1 | 1 | 1% | 2003 | keine | keine | Endoskopische Resektion | Stabile Disease | 03/2016 |
| 1942 | m | Corpus | 1 | 1 | 1,00% | | keine | keine | Unbekannt | Unbekannt | |
| 1942 | w | Corpus und Fundus | 1 | 2 | 2,00% | 2010 | keine | keine | Unbekannt | Progress | 03/2013 |
| 1949 | w | Corpus und Fundus | 1 | 1 | 2,00% | 2012 | keine | keine | Endoskopische Resektion | Remission | 02/2015 |
| 1956 | m | Corpus und Antrum | 1 | 1 | 1,00% | 2002 | keine | keine | Unbekannt | Progress | 06/2012 |
| 1968 | w | Corpus | 1 | 1 | 5-10% | 2009 | keine | keine | Unbekannt | Progress | 03/2012 |
| 1960 | m | Corpus | 1 | 1 | 1,00% | 2004 | keine | keine | Gastrektomie | Remission | 11/2015 |
| 1955 | m | Corpus | 1 | 1 | 15% | 2004 | keine | Hepatisch | Gastrektomie | Progress | 03/2013 |
| 1944 | m | Diffus | 4 | 3 | 25,00% | 2004 | keine | Ossär, hepatisch, pulmonal | Chemotherapie | Tod | 04/2008 |
| 1940 | m | Corpus | 2 | 1 | 1% | 2010 | keine | keine | Unbekannt | Stabile Disease | 11/2011 |
| 1957 | m | Corpus | 1 | 1 | 2,00% | 2011 | keine | keine | Endoskopische Resektion | Remission | 08/2011 |
| 1963 | w | Corpus | 2 | 1 | 7,00% | 2012 | keine | Hepatisch | Lokalexzision | Progress | 07/2015 |
| 1963 | w | Fundus | 1 | 1 | 2,00% | | Übelkeit | keine | Gastrektomie | Progress | 11/2009 |
| 1967 | w | Corpus | 3 | 2 | 5,00% | 2009 | Magenschmerzen | keine | Magenteilresektion | Remission | 08/2015 |

6. Literatur

1. Solcia E, KG, Sobin LH. Histological typing of endocrine tumours. In. *WHO international histological classification of tumours*. Berlin: Springer; 2000.
2. Scherübl H, FS, Jahn H., Klöppel G. . (Neuro-)Endokrine Tumoren des Magens sind auf dem Vormarsch: Gute Prognose bei frühem Nachweis. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift* 2009;**134(30)**:1529-1535
3. Rindi G, Bordi C, Rappel S, La Rosa S, Stolte M, Solcia E. Gastric carcinoids and neuroendocrine carcinomas: pathogenesis, pathology, and behavior. *World J Surg* 1996;**20(2)**:168-72.
4. Klöppel G, Clemens A. The biological relevance of gastric neuroendocrine tumors. *Yale J Biol Med* 1996;**69(1)**:69-74.
5. Ruzniewski P, Delle Fave G, Cadiot G, Komminoth P, Chung D, Kos-Kudla B, Kianmanesh R, Hochhauser D, Arnold R, Ahlman H, Pauwels S, Kwekkeboom DJ, Rindi G. Well-differentiated gastric tumors/carcinomas. *Neuroendocrinology* 2006;**84(3)**:158-64.
6. Rindi G, Azzoni C, La Rosa S, Klersy C, Paolotti D, Rappel S, Stolte M, Capella C, Bordi C, Solcia E. ECL cell tumor and poorly differentiated endocrine carcinoma of the stomach: prognostic evaluation by pathological analysis. *Gastroenterology* 1999;**116(3)**:532-42.
7. Norton JA, Melcher ML, Gibril F, Jensen RT. Gastric carcinoid tumors in multiple endocrine neoplasia-1 patients with Zollinger-Ellison syndrome can be symptomatic, demonstrate aggressive growth, and require surgical treatment. *Surgery* 2004;**136(6)**:1267-74.
8. Matsusaka T, Watanabe H, Enjoji M. Oat-cell carcinoma of the stomach. *Fukuoka Igaku Zasshi* 1976;**67(2)**:65-73.
9. Terada T. Primary small cell carcinoma of the stomach: a case report with an immunohistochemical and molecular genetic analysis. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;**6(3)**:524-30.
10. Matsui K, Kitagawa M, Miwa A, Kuroda Y, Tsuji M. Small cell carcinoma of the stomach: a clinicopathologic study of 17 cases. *Am J Gastroenterol* 1991;**86(9)**:1167-75.
11. Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 5-decade analysis of 13,715 carcinoid tumors. *Cancer* 2003;**97(4)**:934-59.
12. Hemminki K, Li X. Incidence trends and risk factors of carcinoid tumors: a nationwide epidemiologic study from Sweden. *Cancer* 2001;**92(8)**:2204-10.
13. Berge T, Linell F. Carcinoid tumours. Frequency in a defined population during a 12-year period. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 1976;**84(4)**:322-30.
14. Modlin IM, Lye KD, Kidd M. A 50-year analysis of 562 gastric carcinoids: small tumor or larger problem? *Am J Gastroenterol* 2004;**99(1)**:23-32.
15. Tsukamoto H, Mizoshita T, Sasaki M, Mizushima T, Tanida S, Ozeki K, Hirata Y, Shimura T, Kataoka H, Kamiya T, Nojiri S, Tsukamoto T, Tatematsu M, Joh T. Long-term high-dose proton pump inhibitor administration to *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils enhances neuroendocrine tumor development in the glandular stomach. *Asian Pac J Cancer Prev* 2011;**12(4)**:1049-54.
16. Song H, Zhu J, Lu D. Long-term proton pump inhibitor (PPI) use and the development of gastric pre-malignant lesions. *Cochrane Database Syst Rev* 2014(12):Cd010623.
17. Eslami L, Nasserri-Moghaddam S. Meta-analyses: does long-term PPI use increase the risk of gastric premalignant lesions? *Arch Iran Med* 2013;**16(8)**:449-58.
18. Hassan MM, Phan A, Li D, Dagohoy CG, Leary C, Yao JC. Risk factors associated with neuroendocrine tumors: A U.S.-based case-control study. *Int J Cancer* 2008;**123(4)**:867-73.
19. Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch Surg* 2006;**391(5)**:499-510.
20. Burkitt MD, Pritchard DM. Review article: Pathogenesis and management of gastric

- carcinoid tumours. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;**24**(9):1305-20.
21. Borch K, Ahren B, Ahlman H, Falkmer S, Granerus G, Grimelius L. Gastric carcinoids: biologic behavior and prognosis after differentiated treatment in relation to type. *Ann Surg* 2005;**242**(1):64-73.
 22. Roncoroni L, Costi R, Canavese G, Violi V, Bordi C. Carcinoid tumor associated with vascular malformation as a cause of massive gastric bleeding. *Am J Gastroenterol* 1997;**92**(11):2119-21.
 23. Dallal HJ, Ravindran R, King PM, Phull PS. Gastric carcinoid tumour as a cause of severe upper gastrointestinal haemorrhage. *Endoscopy* 2003;**35**(8):716.
 24. Campana D, Nori F, Pezzilli R, Piscitelli L, Santini D, Brocchi E, Corinaldesi R, Tomassetti P. Gastric endocrine tumors type I: treatment with long-acting somatostatin analogs. *Endocrine-related cancer* 2008;**15**(1):337-42.
 25. Johansson H, Wilander E. A clinical study of 30 gastric carcinoids. *Ups J Med Sci* 1982;**87**(2):135-42.
 26. Modlin IM, Gilligan CJ, Lawton GP, Tang LH, West AB, Darr U. Gastric carcinoids. The Yale Experience. *Arch Surg* 1995;**130**(3):250-5; discussion 255-6.
 27. Thomas RM, Baybick JH, Elsayed AM, Sobin LH. Gastric carcinoids. An immunohistochemical and clinicopathologic study of 104 patients. *Cancer* 1994;**73**(8):2053-8.
 28. Barakat MT, Meeran K, Bloom SR. Neuroendocrine tumours. *Endocrine-related cancer* 2004;**11**(1):1-18.
 29. Bordi C, Yu JY, Baggi MT, Davoli C, Pilato FP, Baruzzi G, Gardini G, Zamboni G, Franzin G, Papotti M, Bussolati G. Gastric carcinoids and their precursor lesions. A histologic and immunohistochemical study of 23 cases. *Cancer* 1991;**67**(3):663-72.
 30. Christopoulos C. PE. Gastric neuroendocrine tumors: Biology and management. *ANNALS OF GASTROENTEROLOGY* 2005;**18**(2):127-140.
 31. Yoshikane H, Tsukamoto Y, Niwa Y, Goto H, Hase S, Mizutani K, Nakamura T. Carcinoid tumors of the gastrointestinal tract: evaluation with endoscopic ultrasonography. *Gastrointest Endosc* 1993;**39**(3):375-83.
 32. Zimmer T, Ziegler K, Liehr RM, Stolzel U, Riecken EO, Wiedenmann B. Endosonography of neuroendocrine tumors of the stomach, duodenum, and pancreas. *Ann N Y Acad Sci* 1994;**733**:425-36.
 33. Sjoblom SM, Sipponen P, Karonen SL, Jarvinen HJ. Mucosal argyrophil endocrine cells in pernicious anaemia and upper gastrointestinal carcinoid tumours. *J Clin Pathol* 1989;**42**(4):371-7.
 34. Modlin IM, Lye KD, Kidd M. Carcinoid tumors of the stomach. *Surg Oncol* 2003;**12**(2):153-72.
 35. Cattani D. RA, Launay JM., Callebort J., Courillon-Mallet A. The Stomach as an Endocrine Organ. In: Hankanson R. SF, ed. Elsevier Science; 1991, p 425–448.
 36. Peracchi M, Gebbia C, Basilisco G, Quatrini M, Tarantino C, Vescarelli C, Massironi S, Conte D. Plasma chromogranin A in patients with autoimmune chronic atrophic gastritis, enterochromaffin-like cell lesions and gastric carcinoids. *Eur J Endocrinol* 2005;**152**(3):443-8.
 37. Rindi G, Luinetti O, Cornaggia M, Capella C, Solcia E. Three subtypes of gastric argyrophil carcinoid and the gastric neuroendocrine carcinoma: a clinicopathologic study. *Gastroenterology* 1993;**104**(4):994-1006.
 38. Hosokawa O, Miyanaga T, Kaizaki Y, Hattori M, Dohden K, Ohta K, Ito Y, Aoyagi H. Decreased death from gastric cancer by endoscopic screening: association with a population-based cancer registry. *Scand J Gastroenterol* 2008;**43**(9):1112-5.
 39. Ito T, Tanaka M, Sasano H, Osamura YR, Sasaki I, Kimura W, Takano K, Obara T, Ishibashi M, Nakao K, Doi R, Shimatsu A, Nishida T, Komoto I, Hirata Y, Imamura M, Kawabe K, Nakamura K. Preliminary results of a Japanese nationwide survey of neuroendocrine gastrointestinal tumors. *J Gastroenterol* 2007;**42**(6):497-500.
 40. Landry CS, Brock G, Scoggins CR, McMasters KM, Martin RC, 2nd. A proposed staging system for gastric carcinoid tumors based on an analysis of 1,543 patients. *Ann Surg Oncol*

2009;**16**(1):51-60.

41. Berna MJ, Annibale B, Marignani M, Luong TV, Corleto V, Pace A, Ito T, Liewehr D, Venzon DJ, Delle Fave G, Bordi C, Jensen RT. A prospective study of gastric carcinoids and enterochromaffin-like cell changes in multiple endocrine neoplasia type 1 and Zollinger-Ellison syndrome: identification of risk factors. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;**93**(5):1582-91.
42. Scherubl H, Schaaf L, Raue F, Faiss S, Zeitz M. [Hereditary neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors and multiple endocrine neoplasia type 1. I. Diagnosis]. *Dtsch Med Wochenschr* 2004;**129**(12):630-3.
43. Delle Fave G, O'Toole D, Sundin A, Taal B, Ferolla P, Ramage JK, Ferone D, Ito T, Weber W, Zheng-Pei Z, De Herder WW, Pascher A, Ruzniewski P. ENETS Consensus Guidelines Update for Gastroduodenal Neuroendocrine Neoplasms. *Neuroendocrinology* 2016;**103**(2):119-24.
44. Massironi S, Sciola V, Spampatti MP, Peracchi M, Conte D. Gastric carcinoids: between underestimation and overtreatment. *World J Gastroenterol* 2009;**15**(18):2177-83.
45. Dakin GF, Warner RR, Pomp A, Salky B, Inabnet WB. Presentation, treatment, and outcome of type 1 gastric carcinoid tumors. *J Surg Oncol* 2006;**93**(5):368-72.
46. Gilligan CJ, Lawton GP, Tang LH, West AB, Modlin IM. Gastric carcinoid tumors: the biology and therapy of an enigmatic and controversial lesion. *Am J Gastroenterol* 1995;**90**(3):338-52.
47. Higham AD, Dimaline R, Varro A, Attwood S, Armstrong G, Dockray GJ, Thompson DG. Octreotide suppression test predicts beneficial outcome from antrectomy in a patient with gastric carcinoid tumor. *Gastroenterology* 1998;**114**(4):817-22.
48. Tomassetti P, Migliori M, Caletti GC, Fusaroli P, Corinaldesi R, Gullo L. Treatment of type II gastric carcinoid tumors with somatostatin analogues. *N Engl J Med* 2000;**343**(8):551-4.
49. Kwon YH, Jeon SW, Kim GH, Kim JI, Chung IK, Jee SR, Kim HU, Seo GS, Baik GH, Choi KD, Moon JS. Long-term follow up of endoscopic resection for type 3 gastric NET. *World J Gastroenterol* 2013;**19**(46):8703-8.
50. Steinmuller T, Kianmanesh R, Falconi M, Scarpa A, Taal B, Kwekkeboom DJ, Lopes JM, Perren A, Nikou G, Yao J, Delle Fave GF, O'Toole D. Consensus guidelines for the management of patients with liver metastases from digestive (neuro)endocrine tumors: foregut, midgut, hindgut, and unknown primary. *Neuroendocrinology* 2008;**87**(1):47-62.
51. Scherubl H, Faiss S, Zeitz M. [Neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract--diagnosis and therapy]. *Dtsch Med Wochenschr* 2003;**128 Suppl 2**:S81-3.
52. Toumpanakis C, Meyer T, Caplin ME. Cytotoxic treatment including embolization/chemoembolization for neuroendocrine tumours. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007;**21**(1):131-44.
53. Kouvaraki MA, Ajani JA, Hoff P, Wolff R, Evans DB, Lozano R, Yao JC. Fluorouracil, doxorubicin, and streptozocin in the treatment of patients with locally advanced and metastatic pancreatic endocrine carcinomas. *J Clin Oncol* 2004;**22**(23):4762-71.
54. Arnold R, Rinke A, Schmidt C, Hofbauer L. Endocrine tumours of the gastrointestinal tract: Chemotherapy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005;**19**(4):649-56.
55. Sun W, Lipsitz S, Catalano P, Mailliard JA, Haller DG. Phase II/III study of doxorubicin with fluorouracil compared with streptozocin with fluorouracil or dacarbazine in the treatment of advanced carcinoid tumors: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1281. *J Clin Oncol* 2005;**23**(22):4897-904.
56. Chan JA, Kulke MH. Progress in the treatment of neuroendocrine tumors. *Curr Oncol Rep* 2009;**11**(3):193-9.
57. Kulke MH, Anthony LB, Bushnell DL, de Herder WW, Goldsmith SJ, Klimstra DS, Marx SJ, Pasieka JL, Pommier RF, Yao JC, Jensen RT. NANETS treatment guidelines: well-differentiated neuroendocrine tumors of the stomach and pancreas. *Pancreas* 2010;**39**(6):735-52.
58. Kulke MH. Gastrointestinal neuroendocrine tumors: a role for targeted therapies? *Endocrine-related cancer* 2007;**14**(2):207-19.
59. Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with

- rapamycin derivatives. *Ann Oncol* 2005;**16**(4):525-37.
60. Smolewski P. Recent developments in targeting the mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase pathway. *Anticancer Drugs* 2006;**17**(5):487-94.
61. Chan J, Kulke M. Targeting the mTOR signaling pathway in neuroendocrine tumors. *Curr Treat Options Oncol* 2014;**15**(3):365-79.
62. Nilsson O, Van Cutsem E, Delle Fave G, Yao JC, Pavel ME, McNicol AM, Sevilla Garcia MI, Knapp WH, Kelestimur F, Sauvanet A, Pauwels S, Kwekkeboom DJ, Caplin M. Poorly differentiated carcinomas of the foregut (gastric, duodenal and pancreatic). *Neuroendocrinology* 2006;**84**(3):212-5.
63. Saka M. A case of recurrent gastric carcinoid tumor. *Jpn J Clin Oncol* 2007;**37**(10):801.
64. Navalkissoor S, Flux G, Bomanji J. Molecular radiotheranostics for neuroendocrine tumours. *Clinical medicine (London, England)* 2017;**17**(5):462-468.
65. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development* 2004;**18**(16):1926-45.
66. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 2002;**110**(2):163-75.
67. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 2003;**11**(4):895-904.
68. Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R, Flanigan A, Chen J. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science* 2001;**294**(5548):1942-5.
69. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 2004;**14**(14):1296-302.
70. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 2012;**149**(2):274-93.
71. Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 2002;**10**(3):457-68.
72. Efeyan A, Zoncu R, Sabatini DM. Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease. *Trends Mol Med* 2012;**18**(9):524-33.
73. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;**10**(5):307-18.
74. Copps KD, White MF. Regulation of insulin sensitivity by serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins IRS1 and IRS2. *Diabetologia* 2012;**55**(10):2565-82.
75. Oshiro N, Takahashi R, Yoshino K, Tanimura K, Nakashima A, Eguchi S, Miyamoto T, Hara K, Takehana K, Avruch J, Kikkawa U, Yonezawa K. The proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) is a physiological substrate of mammalian target of rapamycin complex 1. *J Biol Chem* 2007;**282**(28):20329-39.
76. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* 2011;**13**(9):1016-23.
77. Foster DA, Yellen P, Xu L, Saqcena M. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). *Genes Cancer* 2010;**1**(11):1124-31.
78. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974;**71**(4):1286-90.
79. Skotheim JM, Di Talia S, Siggia ED, Cross FR. Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. *Nature* 2008;**454**(7202):291-6.
80. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 2002;**22**(20):7004-14.

81. Harada H, Itasaka S, Kizaka-Kondoh S, Shibuya K, Morinibu A, Shinomiya K, Hiraoka M. The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1 α protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors. *J Biol Chem* 2009;**284**(8):5332-42.
82. Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB, Horton MR. Regulation of immune responses by mTOR. *Annu Rev Immunol* 2012;**30**:39-68.
83. Populo H, Lopes JM, Soares P. The mTOR signalling pathway in human cancer. *Int J Mol Sci* 2012;**13**(2):1886-918.
84. Oshiro N, Yoshino K, Hidayat S, Tokunaga C, Hara K, Eguchi S, Avruch J, Yonezawa K. Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes Cells* 2004;**9**(4):359-66.
85. Yuan R, Kay A, Berg WJ, Lebwohl D. Targeting tumorigenesis: development and use of mTOR inhibitors in cancer therapy. *J Hematol Oncol* 2009;**2**:45.
86. Yao JC, Pavel M, Lombard-Bohas C, Van Cutsem E, Voi M, Brandt U, He W, Chen D, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Hobday T, Pommier R, Oberg K. Everolimus for the Treatment of Advanced Pancreatic Neuroendocrine Tumors: Overall Survival and Circulating Biomarkers From the Randomized, Phase III RADIANT-3 Study. *J Clin Oncol* 2016.
87. Huang Z, Wu Y, Zhou X, Qian J, Zhu W, Shu Y, Liu P. Clinical efficacy of mTOR inhibitors in solid tumors: a systematic review. *Future Oncol* 2015;**11**(11):1687-99.
88. Demetri GD, Chawla SP, Ray-Coquard I, Le Cesne A, Staddon AP, Milhem MM, Penel N, Riedel RF, Bui-Nguyen B, Cranmer LD, Reichardt P, Bompas E, Alcindor T, Rushing D, Song Y, Lee RM, Ebbinghaus S, Eid JE, Loewy JW, Haluska FG, Dodion PF, Blay JY. Results of an international randomized phase III trial of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus versus placebo to control metastatic sarcomas in patients after benefit from prior chemotherapy. *J Clin Oncol* 2013;**31**(19):2485-92.
89. Yang G, Murashige DS, Humphrey SJ, James DE. A Positive Feedback Loop between Akt and mTORC2 via SIN1 Phosphorylation. *Cell Rep* 2015;**12**(6):937-43.
90. Yao JC, Fazio N, Singh S, Buzzoni R, Carnaghi C, Wolin E, Tomasek J, Raderer M, Lahner H, Voi M, Pacaud LB, Rouyrre N, Sachs C, Valle JW, Delle Fave G, Van Cutsem E, Tesselaar M, Shimada Y, Oh DY, Strosberg J, Kulke MH, Pavel ME. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet* 2016;**387**(10022):968-77.
91. Pavel M, Baudin E, Couvelard A, Krenning E, Oberg K, Steinmuller T, Anlauf M, Wiedenmann B, Salazar R. ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with liver and other distant metastases from neuroendocrine neoplasms of foregut, midgut, hindgut, and unknown primary. *Neuroendocrinology* 2012;**95**(2):157-76.
92. Garcia M, Mulvagh SL, Merz CN, Buring JE, Manson JE. Cardiovascular Disease in Women: Clinical Perspectives. *Circulation research* 2016;**118**(8):1273-93.
93. El-Menyar A, Ahmed E, Albinali H, Al-Thani H, Gehani A, Singh R, Al Suwaidi J. Mortality trends in women and men presenting with acute coronary syndrome: insights from a 20-year registry. *PLoS One* 2013;**8**(7):e70066.
94. Kasajima A, Pavel M, Darb-Esfahani S, Noske A, Stenzinger A, Sasano H, Dietel M, Denkert C, Rocken C, Wiedenmann B, Weichert W. mTOR expression and activity patterns in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocrine-related cancer* 2011;**18**(1):181-92.
95. Zatelli MC, Fanciulli G, Malandrino P, Ramundo V, Faggiano A, Colao A. Predictive factors of response to mTOR inhibitors in neuroendocrine tumours. *Endocrine-related cancer* 2016;**23**(3):R173-83.
96. Singh S, Carnaghi C, Buzzoni R, Pommier RF, Raderer M, Tomasek J, Lahner H, Valle JW, Voi M, Bubuteishvili-Pacaud L, Lincy J, Wolin E, Okita N, Libutti SK, Oh DY, Kulke M, Strosberg J, Yao JC, Pavel ME, Fazio N. Everolimus in Neuroendocrine Tumors of the Gastrointestinal Tract and Unknown Primary. *Neuroendocrinology* 2017.

7. Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Konstantin Griniak, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Immunhistochemische Analyse der Expression von mTOR-Pfadweg-Komponenten in Neuroendokrinen Tumoren des Magens“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Konstantin Griniak hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation : Arsenic Ruza, **Konstantin Griniak**, Lohneis Phillip, Stephan Felder, Frank Ulrich Pape, Dietel Manfred, Immunohistochemical Analysis of mTOR Pathway Expression in Gastric Neuroendocrine Tumors, Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2014. Impact Factor 2017 0,50.

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Durchsuchen der Datenbank der Charite nach Patienten mit NET des Magens.
Identifizierung der geeigneten Präparatsnummer in der Datenbank der Charite.
Heraussuchen und Zusammentragen der Paraffinblöcke im Archiv der Charite.
Auswertung der immunhistochemischen Färbungen unter der dem Mikroskop.
Aufarbeitung der Daten zur Weitergabe an die statistische Auswertung.

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9. Publikationsliste

Originalarbeiten

Publikation : Arsenic Ruza, **Konstantin Griniak**, Lohneis Phillip, Stephan Felder, Frank Ulrich Pape, Dietel Manfred, Immunohistochemical Analysis of mTOR Pathway Expression in Gastric Neuroendocrine Tumors, Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2014. Impact Factor 2017 0,50.

10. Dankessagung

Ich danke Frau Dr. med. Ruza Arsenic für die gute Betreuung und die stetige und schnelle Hilfe, wenn ich sie gebraucht habe.

Ich danke ganz herzlich meiner Frau Sarah für Ihre Hilfe und Unterstützung bei der Erstellung und Fertigstellung dieser Arbeit. Ohne Ihre Hilfe und Ihr stetiges Antreiben wäre diese Arbeit niemals fertiggestellt worden.

Danke an Björn Bockelmann für seine Beratung bei der statistischen Auswertung.

Ich danke meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben.

Zudem möchte ich mich bei Ingbert Gille bedanken, der mich unermüdlich vorantrieb und daran erinnerte, diese Arbeit zu Ende zu bringen.